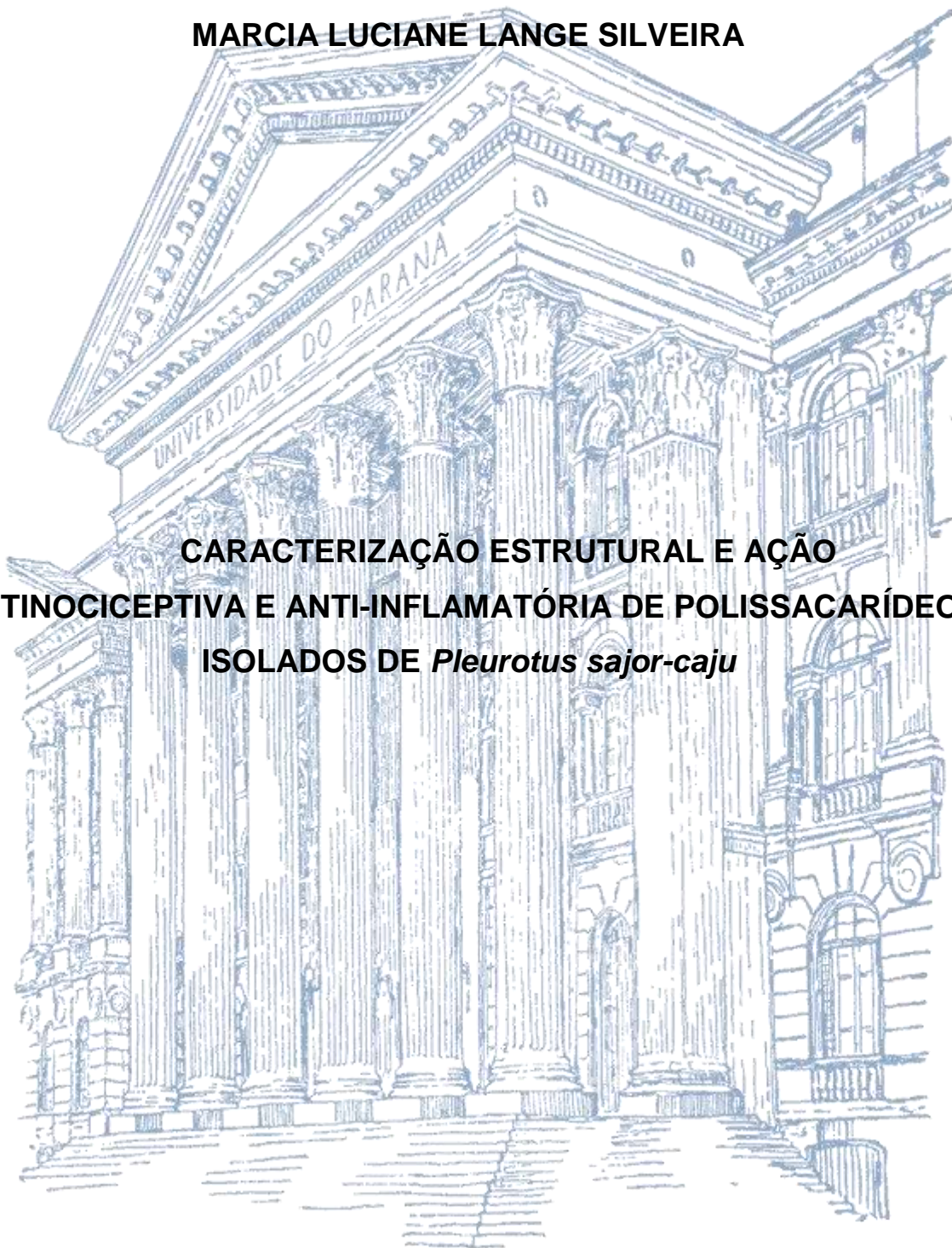


**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**MARCIA LUCIANE LANGE SILVEIRA**

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E AÇÃO  
ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DE POLISSACARÍDEOS  
ISOLADOS DE *Pleurotus sajor-caju***



**CURITIBA**

**2015**

**MARCIA LUCIANE LANGE SILVEIRA**

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E AÇÃO  
ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DE POLISSACARÍDEOS  
ISOLADOS DE *Pleurotus sajor-caju***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências – Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Marcello Iacomini

Co-orientadores: Prof. Dr. Thales Ricardo Cipriani

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elisabeth Wisbeck

CURITIBA

2015

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

Silveira, Marcia Luciane Lange da

Caracterização estrutural e ação antinociceptiva e anti-inflamatória de polissacarídeos isolados de *Pleutorus sajor-caju* / Marcia Luciane Lange Silveira. – Curitiba, 2015.

179 f. : il., tabs. grafs.

Orientador: Marcello Iacomini

Co-orientadores: Thales Ricardo Cipriani e Elisabeth Wisbeck

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica.

1. Cogumelos. 2. Atividade antinociceptiva. 3. Agentes antiinflamatórios. 4. Polissacarídeos. I. Iacomini, Marcello. II. Cipriani, Thales Ricardo. III. Wisbeck, Elisabeth. IV. Título. V. Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica.


CDD (20. ed.) 574.192

## TERMO DE APROVAÇÃO

MARCIA LUCIANE LANGE SILVEIRA


Caracterização estrutural e ação antinociceptiva e anti-inflamatória de polissacarídeos isolados de *Pleurotus sajor-caju*

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



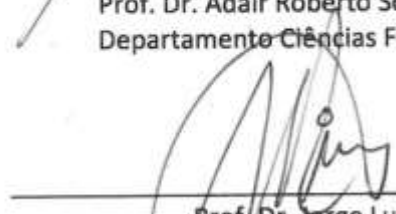
---

Prof. Dr. Marcello Iacomini – Orientador  
Departamento de Bioquímica, UFPR



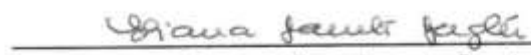
---

Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos  
Departamento Ciências Fisiológicas, UFSC




---

Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow  
Departamento de Engenharia de Alimentos, UFSC



---

Prof.ª Dr.ª Eliana Barreto-Bergter  
Instituto de Microbiologia, UFRJ



---

Prof.ª Dr.ª Lucimara M. C. Cordeiro  
Departamento de Bioquímica, UFPR

Curitiba, 16 de abril de 2015.

***Dedico este trabalho às pessoas que se privaram de meu convívio para que este pudesse ser realizado.***

***A você, amor de minha vida, meu lindo e amado esposo, que soube perdoar as ausências, entender a distância e me incentivar a continuar quando eu não tinha forças para isto.***

***A vocês meus amados filhos, por entender que a mãe precisava estudar (mais que vocês) e permitir que isto acontecesse. Minha vida não seria completa sem vocês.***

***Aos meus pais, pelo exemplo de vida, conduta, conselhos e cuidados que, mesmo eu sendo mãe, vocês ainda tem comigo como filha. Por perceberem, antes mesmo que eu, a capacidade que existia para ensinar.***

## **AGRADECIMENTOS**

Muitos são os que merecem agradecimentos pelo auxílio na realização desta tese, tendo contribuído para o andamento do trabalho, dedicando seu tempo e conhecimento, ou ainda contribuindo com risos e abraços, tão necessários para uma vida feliz. Agradeço a todos que compartilharam comigo estes quatro anos, auxiliando em meu crescimento pessoal e profissional. À todos, meu muito obrigado.

Ao meu orientador, Professor Dr. Marcello Iacomini, por ter aceitado a orientação neste doutorado, sem conhecer-me pessoalmente. Agradeço toda a dedicação de seu tempo, suas orientações e por entender minhas dificuldades e ausências. Por permitir que este trabalho fosse desenvolvido em Joinville e em Curitiba, sempre demonstrando que confiava em mim. Aprendi muito ao seu lado!

Ao meu co-orientador, Professor Dr. Thales Ricardo Cipriani, por apresentar-me ao Professor Marcello, por ter dedicado seu tempo ao meu aprendizado desde o início do doutorado e seu tempo para a revisão dos meus trabalhos, inclusive nos seus períodos de férias. Obrigado!

À minha co-orientadora, Professora Dr<sup>a</sup>. Elizabeth Wisbeck, pelas horas de orientação no laboratório durante o período de mestrado, pelas orientações e correções desta tese, assim como, pelas conversas e pela amizade. Obrigado!

À Professora Dr<sup>a</sup>. Sandra Aparecida Furlan, coordenadora do grupo de pesquisa ao qual pertenço. Agradeço por me incentivar no caminho da pesquisa e por buscar condições para que nossos projetos sempre

fossem realizados. Pelo desafio e incentivo a seguir uma profissão maravilhosa - ser professor - com a qual me sinto identificada e realizada. Obrigado!

Ao Professor Dr. Jorge Luiz Ninow, meu orientador de Iniciação Científica, agradeço por ter me apresentado o caminho da pesquisa através da Iniciação Científica, assim como, ter colaborado com este trabalho por participar da banca de avaliação. Obrigado!

À Professora Dr<sup>a</sup>. Lucimara Mach C. Cordeiro, agradeço pelas correções de meus relatórios, pelas discussões e ensinamentos durante o doutorado. Agradeço também por participar como membro da banca de avaliação deste trabalho. Obrigado!

À Dr<sup>a</sup>. Andréa Carolina Ruthes, agradeço pelas orientações, pelo tempo dedicado aos meus relatórios e paciência nas explicações. Obrigado!

Ao Professor Dr. Eliana Barreto-Bergter, agradeço pela colaboração para a finalização deste trabalho como membro da banca de avaliação. Obrigado!

Ao Professor Dr. Adair Roberto Soares dos Santos, agradeço pela colaboração para a finalização deste trabalho como membro da banca de avaliação. Obrigado!

À Dr<sup>a</sup>. Fhernanda Ribeiro Smiderle, agradeço por sua dedicação, pelo tempo disponibilizado a ensinar e pela amizade. Por ter compartilhado este caminho, sempre com a mão estendida para auxiliar-me. À você meu reconhecimento. Desejo que nossa amizade seja longa e duradoura. Obrigado!

À Professora Dr<sup>a</sup>. Mariane Bonatti Chaves, Professora MSc. Jamile Rampinelli e Professor MSc. Eduardo Manoel Pereira por trilharem comigo o caminho durante todos estes anos. Obrigado pelas conversas, amizade e pelos planos para futuros projetos.

À Professora Dr<sup>a</sup>. Cristiane Baggio pelo auxílio na realização dos ensaios biológicos. Obrigado!

À todos os meus orientandos, Karyn, Letícia, Thierry, Bárbara, Bruna, Elizângela, Rafaela, Leandro, Nicole, assim como, Franciane, Carla, Ivaneliza, Jean e Elisa, pelo desafio à buscar compreender melhor para ensinar melhor. Agradeço a cada um de vocês pela possibilidade de dividir o meu saber e de somar conhecimento na busca de novos desafios.

Aos novos amigos que fiz durante estes quatro anos na UFPR, amigos da química de carboidratos, laboratórios 252, 247, 250 e E1, desejo muito trabalho, pois o sucesso é uma consequência não um objetivo (Gustave Flaubert) e este (sucesso) só vem antes do trabalho no dicionário (Albert Einstein).

Ao Professor Dr. Guilherme Lanzi Sassaki e ao Dr. Arquimedes P. de Santana-Filho, pela disponibilidade para a realização das análises de RMN e auxílio na compreensão dos resultados.

À Elisângela A. Rodrigues e Rosane pela disponibilidade para a realização das análises de HPSEC-MALLS e de CG-MS.

À minha mãe, Dorvalina, exemplo de mulher e de profissional, sempre auxiliando e acreditando em mim. Obrigado por seu amor, sua paciência, sua compreensão, sua dedicação e suas orações. Que Deus lhe conceda muito tempo e muitas bênçãos, para que eu possa viver ao seu lado e contar com seus conselhos. Que meus filhos possam aprender muito contigo.



À meu pai, Victor, sempre presente, por cartas, telefone ou mesmo em orações. Obrigado por seres meu porto seguro. Por seu amor e sua dedicação, seu exemplo e sua bondade. Peço a Deus que lhe conceda tempo nesta vida para que possas, ao lado da mãe, curtir seus netos.

À vocês dois, sem os quais minha vida não existiria, dedico esta canção: Como é grande o meu amor por você (s) (Roberto Carlos).

À meu irmão Marcos e minha cunhada Fernanda, não só por permitirem estar em seu lar durante semanas nestes quatro anos, mas por compartilharem a trajetória comigo. À este irmão mais novo que me ensinou, através dos conflitos, a escutar e ter paciência. Eu não seria como sou sem a sua presença. Obrigado mano, você sempre está em minhas orações e em meu coração. À minha cunhada, por todas as horas de conversas e que me agraciou com um sobrinho, Eduardo e com um afilhado lindo, Pedro, pelos quais tenho paixão. Obrigado por me tornar titia e dinda destes dois meninos lindos. Agradeço a Deus por ter te colocado no caminho do meu irmão, pois és uma pessoa justa, sincera, amável e muito dedicada a família.

Ao meu esposo, César, não tenho palavras... você é tudo... Nossas músicas Anjo (Roupa Nova) e Sozinho (Caetano Veloso), sem falar em todas as outras que fizeram parte da trilha sonora de nossa vida. Uma vida feliz, compartilhada e da qual não me arrependo. Te amo!

Aos meus filhos, João Victor e Luíza, que amo mais que a mim mesma. Desejo que vocês errem na mesma medida que acertem, pois os erros ensinam os caminhos e os acertos ensinam a comemorar, agradecer e continuar buscando mais e mais. Sejam felizes!

Aos meus sogros, João Carlos e Graça, pelo carinho que tem por mim, me aceitando como filha, por seus conselhos, seu auxílio durante a

realização deste trabalho e suas orações. Por sempre estarem disponíveis para meus filhos. Obrigado.

Aos meus cunhados e cunhadas, Ricardo e Fabíola, Fábio e Gisele, Marcos e Magali, Aline e Alessandro, agradeço pelos sobrinhos lindos, pelos momentos de descontração, risadas, passeios, bares e muitas histórias para contar.

Aos coordenadores do Curso de Pós-Graduação, Professora Dr<sup>a</sup>. Sílvia Maria Suter Correia Cadena e Professor Dr. Emanuel Maltempi de Souza pelo empenho e dedicação prestados e ao crescimento e reconhecimento deste curso.

A todos os professores, pós-graduandos e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR, pela colaboração e amizade.

Aos amigos da Universidade da Região de Joinville, pelas horas de trabalho e descontração.

À UNIVILLE, ao PRONEX-Carboidratos, Fundação Araucária e CNPq pelo apoio financeiro.

Aos animais de laboratório, meu total respeito. Com suas vidas vocês engrandecem a nossa. Obrigado!

Aos que me oportunizaram participar de seu caminho, saibam que sem vocês o caminho não seria o mesmo. Obrigado!

E, por último, agradecer aquele que é essencial – Deus - que me abençoou e colocou todas estas pessoas no meu caminho. Glória a Deus nas alturas! E na terra paz, boa vontade para com os homens. Nós te louvamos, bendizemos, adoramos; nós te glorificamos e te damos graças por tua grande glória. Ó Senhor Deus, Rei dos céus, Deus Pai onipotente.

Ó Senhor, unigênito filho, Jesus Cristo; ó Senhor Deus, Cordeiro de Deus, Filho do Pai, que tiras o pecado do mundo, tem compaixão de nós. Tu, que tiras os pecados do mundo, recebe a nossa deprecação. Tu, que estas sentado à mão direita de Deus Pai, tem compaixão de nós, por que só tu és santo, só tu és o Senhor. Só tu, ó Cristo, juntamente com o Espírito Santo, és o Altíssimo na glória de Deus Pai. Amém!

“O acaso só favorece aos espíritos preparados  
e não prescinde da observação.”

*(Louis Pasteur)*

## RESUMO

Os cogumelos despertam o interesse de vários pesquisadores devido ao seu elevado valor gastronômico e à presença de polissacarídeos de interesse farmacológico. Assim sendo, este trabalho apresenta a produção, extração, purificação e caracterização estrutural de polissacarídeos intra e extracelulares oriundos do cultivo submerso de *Pleurotus sajor-caju* em biorreator, bem como de polissacarídeos constituintes de seus corpos frutíferos cultivados em palha de folhas de bananeira. Além disso, serão avaliadas as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória destes polissacarídeos. Para o cultivo em biorreator foi utilizado o meio POL, sem extrato de levedura. A extração de polissacarídeos foi realizada com água a frio e a quente, e com solução de hidróxido de potássio a 2%. A purificação dos polissacarídeos extraídos foi realizada por processos de congelamento e descongelamento, diálise e ultrafiltração. Análises de composição monossacarídica, homogeneidade, metilação, ressonância magnética nuclear e degradação controlada de Smith foram utilizadas para caracterizar os polissacarídeos purificados. Com o cultivo submerso foi obtida uma concentração máxima de EPS de 0,94 g L<sup>-1</sup>, em 256,5 h de cultivo, com uma concentração de biomassa micelial de 3,07 g L<sup>-1</sup>. As produtividades totais para biomassa micelial e exopolissacarídeos (EPS) foram de 11,98 mg L<sup>-1</sup> e 3,68 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Este cultivo foi classificado como tipo I pela classificação de Gaden, indicando que a produção de EPS está associada ao aumento de concentração de biomassa micelial. Três manogalactanas foram caracterizadas, uma derivada do caldo de cultivo (PEIsR), uma do extrato aquoso frio dos corpos frutíferos (U100E-SCW) e outra da biomassa micelial (SE-SICW). Comparando a estrutura das três manogalactanas, aquela derivada do caldo de cultivo apresentou um maior teor de 3-O-metil-galactose. Outros dois polímeros derivados do extrato aquoso quente dos corpos frutíferos (GHW e U100R-SHW) e um do extrato aquoso quente da biomassa micelial (M-U3SHW) foram caracterizados como β-D-glucanas (1→3),(1→6)-ligadas. Também foram caracterizadas β-D-glucanas lineares (1→3)-ligadas, uma derivada da biomassa micelial (IM-IHW) e outra do corpo frutífero (G-PHW), ainda não relatadas para fungos do gênero *Pleurotus*. Os resultados dos ensaios biológicos mostraram que a manogalactana (PEIsR) de caldo de cultivo, e as β-D-glucanas (1→3),(1→6)-ligada (GHW) e (1→3)-ligada (G-PHW) derivadas de corpos frutíferos apresentam efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório. Portanto, este trabalho comprova que o cultivo líquido pode ser utilizado para produzir polissacarídeos similares aos presentes nos corpos frutíferos obtidos pelo método tradicional (cultivo sólido) e que os polissacarídeos extraídos e caracterizados possuem atividade antinociceptiva e anti-inflamatória.

## ABSTRACT

Mushrooms attract the interest of many researchers due to their high gastronomic value and the presence of pharmacologically active polysaccharides. Therefore, this work presents the production, extraction, purification, and structural characterization of intra- and extracellular polysaccharides from a submerged cultivation of *Pleurotus sajor-caju* in bioreactor, as well as of polysaccharides from their fruiting bodies cultivated in banana leaves straw. Moreover, the antinociceptive and anti-inflammatory activities of these polysaccharides are evaluated. The bioreactor cultivation was conducted with POL medium without yeast extract. The polysaccharides extraction was carried out with cold and hot water, and with 2% potassium hydroxide solution. The purification of the extracted polysaccharide was performed by freezing and thawing processes, dialysis and ultrafiltration. Analysis of monosaccharide composition, homogeneity, methylation, nuclear magnetic resonance and Smith controlled degradation were used to characterize the purified polysaccharides. From the submerged culture a maximum EPS concentration of 0.94 g L<sup>-1</sup> at 256.5 h was obtained, with a mycelial biomass concentration of 3.07 g L<sup>-1</sup>. The total productivities for mycelial biomass and EPS were 11.98 mg L<sup>-1</sup> and 3.68 mg L<sup>-1</sup>, respectively. According to the Gaden rating, this culture was classified as type I, indicating that the EPS production is associated with an increase in the mycelial biomass concentration. Three mannogalactans were characterized, one derived from the culture broth (PEIsR), one from cold aqueous extract of fruiting bodies (U100E-SCW) and another from the mycelial biomass (SE-SICW). Comparing these mannogalactans, the one from the culture broth had the biggest proportion of 3-O-methyl-galactose units. Two other polymers from the hot aqueous extract of fruiting bodies (GHW and U100R-SHW), and one from the hot water extract of mycelial biomass (M-U3SHW) were characterized as (1→3),(1→6)-linked β-D-glucans. A linear (1→3)-linked β-D-glucan from mycelial biomass (IM-IHW) and another from fruiting bodies (G-PHW) were also characterized. This structure has not yet been reported for *Pleurotus* genus. The results of biological tests showed that the mannogalactan (PEIsR) from culture broth, and the (1→3),(1→6)-linked (GHW) and (1→3)-linked β-D-glucans (PHW-G) from fruit bodies have antinociceptive and anti-inflammatory effects. Therefore, this study shows that the submerged culture can be used to produce polysaccharides similar to those ones from fruiting bodies obtained with a traditional method (solid culture) and that the extracted and characterized polysaccharides present antinociceptive and anti-inflammatory activities.

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS, SIGLAS E TERMOS

### Siglas

BPF	–	Boas práticas de fabricação
APIs	–	Substâncias farmacêuticas ativas
RRTIs	–	Infecções recorrentes do trato respiratório
CCB 019	–	Linhagem de <i>Pleurotus sajor-caju</i>

### Compostos químicos

ACTB	–	Actina
B1 (vitamina)	–	Tiamina
B2 (vitamina)	–	Riboflavina
cDNA	–	DNA complementar
CLT	–	Linfócitos T citotóxicos
CMC	–	Carboximetilcelulose
COX	–	Cicloxigenase
COX-2	–	Cicloxigenase-2
CR3	–	Receptor de complemento 3
D <sub>2</sub> O	–	Água deuterada
DNA	–	Ácido desoxirribonucleico
Galp	–	Galactose piranosídica
GAPDH	–	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
Glc <sub>p</sub>	–	Glucose piranosídica
HepG2	–	células tumorais do tecido hepático

HL-60	– células de leucemia
HT-29	– Células de tumor de cólon humano
HTAB	– Brometo de hexadeciltrimetilamônio
IL	– Interleucinas
IL-1 $\beta$	– Interleucina-1 $\beta$
IL-2	– Interleucina-2
IL-6	– Interleucina-6
IL-8	– Interleucina-8
IL-12	– Interleucina-12
iNOS	– Óxido nítrico sintase induzível
LDL	– Lipoproteína de baixa densidade
LPS	– Lipopolissacarídeo bacteriano
Man $p$	– Manose piranosídica
Me <sub>2</sub> SO-d <sub>6</sub>	– Dimetilsulfóxido deuterado
MPO	– Mieloperoxidase
mRNA	– RNA mensageiro
NABD <sub>4</sub>	– boroidreto de sódio deuterado
NK	– Células <i>natural killer</i>
PBS	– Solução salina tamponada com fosfato
PCK	– Proteína quinase C
pH	– Potencial hidrogeniônico
PMA	– Forbol-12-miristato-13-acetato
POL	– Meio de cultivo para produção de polissarídeos extracelulares
RNA	– Ácido ribonucleico
THP-1	– células de monócitos humanos do tipo THP-1
TLR-2	– Receptor <i>Toll-like 2</i>



TLR-4	– Receptor <i>Toll-like</i> 4
TMB	– 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina em dimetilformamida
TNF- $\alpha$	– Fator de necrose tumoral- $\alpha$
TRIS	– Tampão 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol

### **Amostras, extratos e frações**

CMHAE	– Polissacarídeo solúvel em água e carboximetilado
CW	– Fração solúvel em água fria
EPS	– Exopolissacarídeo
GE	– Extrato contendo $\alpha$ -glucana e $\beta$ -glucana
GHW	– Fração insolúvel após centrifugação de HW obtida de corpos frutíferos
G-PHW	– $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3)-ligada (fração insolúvel após processo de congelamento e descongelamento de M-PHW)
HA	– Fração solúvel em solução de hidróxido de potássio a 2%
HW	– Fração solúvel em água quente
ICW	– Fração retida após diálise de CW obtida de biomassa micelial
IHW	– Fração insolúvel após processo de congelamento e descongelamento da fração retida após diálise de HW obtida de biomassa micelial
IM-IHW	– $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3)-ligada (fração insolúvel após processo de congelamento e descongelamento de M-IHW)
M-IHW	– Fração solúvel após extração com dimetilsulfóxido de ICW
M-PHW	– Fração solúvel após extração com dimetilsulfóxido em PHW
M-U3SHW	– $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-ligada (fração solúvel em extração com dimetilsulfóxido da fração solúvel no processo de congelamento e descongelamento de U3SHW)

PE1	– Precipitado etanólico de caldo de cultivo
PEE	– Sobrenadante etanólico de caldo de cultivo
PEI	– Fração retida na diálise do precipitado do caldo de cultivo
PEIi	– Fração insolúvel após processo de congelamento e descongelamento da fração PEI
PEIs	– Fração solúvel após processo de congelamento e descongelamento da fração PEI
PEIsE	– Fração eluída em diálise de PEIs
PEIsR	– Manogalactana oriunda do caldo de cultivo (fração retida na diálise de PEIs)
PEPw	– Polissacarídeo solúvel em água
PHW	– Fração insolúvel após processo de congelamento e descongelamento da fração retida em diálise da fração solúvel de HW obtida de corpos frutíferos
PM2	– Micélio deslipidificado
POPS-1	– Polissacarídeo solúvel em água
POPw	– Polissacarídeo solúvel em água
PSF	– Exopolissacarídeo desproteínizado
PS-I	– $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 6)-ligada
SCW	– Fração solúvel após processo de congelamento e descongelamento da fração retida em diálise de CW obtida de corpos frutíferos
SE-SICW	– Manogalactana oriunda da biomassa micelial
SHA	– Fração solúvel após processo de congelamento e descongelamento da fração retida em diálise de HA
SHWc	– Fração solúvel após processo de congelamento e descongelamento da fração retida em diálise da fração solúvel de HW obtida de corpos frutíferos

SHWb	– Fração solúvel após processo de congelamento e descongelamento da fração retida após diálise de HW obtida de biomassa micelial
SICW	– Fração solúvel após processo de congelamento e descongelamento da fração ICW
U100E-SCW	– Fração eluída após ultrafiltração de SCW
U100R-SHW	– $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-ligada (fração retida após ultrafiltração de SHWc)
U3SHW	– Fração eluída após ultrafiltração de SHWb

### **Meios de cultivo, técnicas de análises e termos associados**

$\delta$	– Deslocamento químico
ANOVA	– Análise de variância
BD	– Meio de cultivo batata dextrose
CN	– Grupo não tratado
Dexa	– Dexametasona
$dn/dc$	– Taxa de variação do índice de refração com relação à concentração
E	– Concentração de EPS no tempo de processo ( $\text{g L}^{-1}$ )
$E_0$	– Concentração de EPS no início do processo (tempo inicial) ( $\text{g L}^{-1}$ )
GC-EM	– Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
HPLC	– Cromatografia líquida de alta eficiência
HPSEC	– Cromatografia de exclusão estérica
HSQC	– Heteronuclear single-quantum correlation
i.p.	– Intraperitoneal

$J_{C-1,H-1}$	– Constante de acoplamento carbono-próton
$K_{La}$	– Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $h^{-1}$ )
$m/v$	– Relação massa/volume
$m/z$	– Relação massa/carga
MRS	– Meio de cultivo ágar <i>Lactobacillus</i>
MS	– Espectrometria de massas
$n$	– Número de camundongos por grupo
NMR	– Ressonância magnética nuclear
$p$	– Nível de significância
PA	– Para análise
PCR	– Reação em cadeia da polimerase
POL	– Meio de cultivo para produção de polissacarídeos
QP	– Produtividade total em EPS ( $mg\ L^{-1}\ h^{-1}$ )
q-PCR	– PCR quantitativo
QX	– Produtividade total em biomassa micelial ( $mg\ L^{-1}\ h^{-1}$ )
RPMI	– Meio Roswell Park Memorial Institute
$S$	– Concentração final de glucose no tempo de processo ( $g\ L^{-1}$ )
$S_0$	– Concentração de glucose no tempo inicial ( $g\ L^{-1}$ )
$t$	– Tempo de processo (h) - tempo no qual a concentração de EPS atingiu seu valor máximo e tornou-se constante
TDA	– Meio de cultivo trigo dextrose ágar
$v/m$	– Relação volume/massa
$v/v$	– Relação volume/volume
$X$	– Concentração de biomassa micelial no tempo de processo ( $g\ L^{-1}$ )

$X_0$	– Concentração de biomassa micelial no início do processo (tempo inicial) ( $\text{g L}^{-1}$ )
$Y_{P/S}$	– Fator de conversão de glucose em EPS ( $\text{g g}^{-1}$ )
$Y_{X/S}$	– Fator de conversão de glucose em biomassa micelial ( $\text{g g}^{-1}$ )

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – HIFAS SEPTADAS (A) E MICÉLIO (B) DE FUNGOS PLURICELULARES .....	36
FIGURA 2 – CICLO DE REPRODUÇÃO DOS BASIDIOMICETOS.....	37
FIGURA 3 – DESENHO ESQUEMÁTICO DAS PRINCIPAIS ESTRUTURAS DE UM BASIDIOMICETO .....	38
FIGURA 4 – ESPÉCIES DE <i>Pleurotus ostreatus</i> (A), <i>Pleurotus djamor</i> (B), <i>Pleurotus citrinopileatus</i> (C), <i>Pleurotus ostreatoroseus</i> (D), <i>Pleurotus eryngii</i> (E), <i>Pleurotus pulmonarius</i> (F).....	40
FIGURA 5 - ETAPAS DO PROCESSO DE CULTIVO DE <i>Pleurotus</i> .....	42
FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PAREDE CELULAR DE <i>Aspergillus fumigatus</i> . ....	48
FIGURA 7 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DE UMA MANOGALACTANA (A) E $\beta$ -D-GLUCANA (1→3),(1→6)-LIGADA (B) DE FUNGOS FILAMENTOSOS .....	51
FIGURA 8 – MICÉLIO DE <i>Pleurotus sajor-caju</i> CRESCIDO EM PLACA DE PETRI COM MEIO TDA.....	70
FIGURA 9 – FLUXOGRAMA DE PRODUÇÃO DOS CORPOS FRUTÍFEROS DE <i>P. sajor-caju</i> .....	71
FIGURA 10 – GRÃOS DE TRIGO COM DISCO DE TDA CONTENDO MICÉLIO (A) E DE GRÃOS DE TRIGO COM COLONIZAÇÃO COMPLETA PELO MICÉLIO (B) DE <i>P. sajor-caju</i> .....	72
FIGURA 11 – PACOTES COM PALHA DE BANANEIRA COLONIZADAS POR <i>P. sajor-caju</i> .....	73
FIGURA 12 – CÂMARA DE CULTIVO COM PACOTES DE SUBSTRATO INOCULADO.....	73

FIGURA 13 – PACOTES COM <i>P. sajor-caju</i> EM DIFERENTES FASES DE CRESCIMENTO: MICÉLIO DIFERENCIANDO EM PRIMÓRDIOS (A), PRIMÓRDIOS EM DESENVOLVIMENTO (B), CORPOS FRUTÍFEROS FORMADOS (C).....	74
FIGURA 14 – INÓCULO LÍQUIDO DE <i>P. sajor-caju</i> EM FRASCO DURAN .....	75
FIGURA 15 – CULTIVO DE <i>P. sajor-caju</i> EM BIORREATOR: TEMPO INICIAL (A), TEMPO FINAL (B).....	76
FIGURA 16 – FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS ORIUNDOS DE CORPOS FRUTÍFEROS DE <i>P. sajor-caju</i> .....	78
FIGURA 17 – FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS ORIUNDOS DA BIOMASSA MICELIAL DE <i>P. sajor-caju</i> .....	79
FIGURA 18 – FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS ORIUNDOS DO CALDO DE CULTIVO DE <i>P. sajor-caju</i> .....	82
FIGURA 19 - CURVAS CINÉTICAS DE CONCENTRAÇÃO DE GLUCOSE (S), AUMENTO DE BIOMASSA MICELIAL (X) E DE PRODUÇÃO DE EPS (EPS) POR TEMPO DE CULTIVO DE <i>P. sajor-caju</i> .....	96
FIGURA 20 - FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DA MANOGALACTANA EXTRAÍDA DO CALDO DE CULTIVO DE <i>P. sajor-caju</i> .....	98
FIGURA 21 - PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC DAS FRAÇÕES PEI, PEIs E PEIsR DERIVADAS DO CALDO DE CULTIVO DE <i>P. sajor-caju</i> .....	100
FIGURA 22 - ESPECTRO DE HSQC, SOBREPOSTO POR TOCSY 1D SELETIVO DA FRAÇÃO PEIsR OBTIDA DO CALDO DE CULTIVO DE <i>P. sajor-caju</i> .....	101
FIGURA 23 - POSSÍVEL FRAGMENTO DA ESTRUTURA DA MANOGALACTANA OBTIDA DO CALDO DE CULTIVO DE <i>P. sajor-caju</i> .....	103

FIGURA 24 - FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA MANOGALACTANA DERIVADA DA BIOMASSA MICELIAL DE <i>P. sajor-caju</i> .....	104
FIGURA 25 - PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC DAS FRAÇÕES SICW (A) E SE-SICW (B), DERIVADAS DA BIOMASSA MICELIAL DE <i>P. sajor-caju</i> .....	105
FIGURA 26 - FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA MANOGALACTANA, DERIVADA DE CORPOS FRUTÍFEROS DE <i>P. sajor-caju</i> .....	106
FIGURA 27 - PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC DAS FRAÇÕES SCW (A) E U100E-SCW (B), DERIVADAS DOS CORPOS FRUTÍFEROS DE <i>P. sajor-caju</i> .....	107
FIGURA 28 - ESPECTRO DE HSQC DAS FRAÇÕES PEIsR (CALDO DE CULTIVO), SE-SICW (BIOMASSA MICELIAL) E U100E-SCW (CORPOS FRUTÍFEROS) OBTIDOS DE <i>P. sajor-caju</i> .....	110
FIGURA 29 - FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DAS GLUCANAS PRESENTES NOS CORPOS FRUTÍFEROS DE <i>P. sajor-caju</i> .....	112
FIGURA 30 - ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C DA FRAÇÃO GEL GHW, DERIVADA DO EXTRATO AQUOSO QUENTE DOS CORPOS FRUTÍFEROS DE <i>P. sajor-caju</i> .....	113
FIGURA 31 - ESPECTRO DE HSQC DA FRAÇÃO GEL GHW, DERIVADA DO EXTRATO AQUOSO QUENTE DOS CORPOS FRUTÍFEROS DE <i>P. sajor-caju</i> .....	114
FIGURA 32 - ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C DA FRAÇÃO GEL GHW RESISTENTE A DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH .....	115
FIGURA 33 - PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC DA FRAÇÃO U100R-SHW DERIVADA DE CORPOS FRUTÍFEROS DE <i>P. sajor-caju</i> .....	116
FIGURA 34 - ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C DA FRAÇÃO U100R-SHW, DERIVADA DOS CORPOS FRUTÍFEROS DE <i>P. sajor-caju</i> ..	117
FIGURA 35 - ESPECTRO DE HSQC DA FRAÇÃO U100R-SHW, DERIVADA DOS CORPOS FRUTÍFEROS DE <i>P. sajor-caju</i> .....	118



FIGURA 36 - ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C DA FRAÇÃO U100R-SHW RESISTENTE A UM CICLO (A) E DOIS CICLOS (B) DE DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH.....	120
FIGURA 37 - FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA GLUCANA PRESENTES NO EXTRATO ALCALINO DOS CORPOS FRUTÍFEROS DE <i>P. sajor-caju</i> ...	121
FIGURA 38 - ESPECTRO DE HSQC DA FRAÇÃO SHA, DERIVADA DOS CORPOS FRUTÍFEROS DE <i>P. sajor-caju</i> .....	122
FIGURA 39 - FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DAS GLUCANAS PRESENTES NA BIOMASSA MICELIAL DE <i>P. sajor-caju</i> .....	124
FIGURA 40 - PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC DA FRAÇÃO U3SHW DERIVADA DE BIOMASSA MICELIAL DE <i>P. sajor-caju</i> .....	125
FIGURA 41 - ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C DA FRAÇÃO U3SHW, DERIVADA DA BIOMASSA MICELIAL DE <i>P. sajor-caju</i> .....	125
FIGURA 42 - PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC DA FRAÇÃO M-U3SHW DERIVADA DE BIOMASSA MICELIAL DE <i>P. sajor-caju</i> .....	126
FIGURA 43 - ESPECTRO DE HSQC DA FRAÇÃO M-U3SHW, DERIVADA DA BIOMASSA MICELIAL DE <i>P. sajor-caju</i> .....	127
FIGURA 44 - ACOMPANHAMENTO DE PURIFICAÇÃO PELOS ESPECTROS DE RMN- <sup>13</sup> C DAS FRAÇÕES CONTENDO β-D-GLUCANA, DERIVADAS DOS CORPOS FRUTÍFEROS DE <i>P. sajor-caju</i> . (A) PHW, (B) M-PHW E (C) G-PHW (β-D-GLUCANA PURIFICADA) .....	130
FIGURA 45 - ESPECTRO DE HSQC DA β-D-GLUCANA (G-PHW), DERIVADA DE CORPOS FRUTÍFEROS DE <i>P. sajor-caju</i> .....	131
FIGURA 46 - ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C DA β-D-GLUCANA (M-IHW), DERIVADA DA BIOMASSA MICELIAL DE <i>P. sajor-caju</i> .....	133
FIGURA 47 - ESPECTRO DE HSQC DA β-D-GLUCANA (IM-IHW), DERIVADA DE BIOMASSA MICELIAL DE <i>P. sajor-caju</i> .....	133
FIGURA 48 - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DA MANOGALACTANA (PEIsR) DERIVADA DO CALDO DE CULTIVO DE <i>P. sajor-caju</i> SOBRE O	

	NÚMERO DE CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS POR ÁCIDO ACÉTICO EM CAMUNDONGOS .....	136
FIGURA 49 -	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DA MANOGALACTANA (PEIsR) DERIVADA DO CALDO DE CULTIVO DE <i>P. sajor-caju</i> SOBRE O TEMPO DE COMPORTAMENTO NOCICEPTIVO NA PRIMEIRA E SEGUNDA FASES DO TESTE DE FORMALINA EM CAMUNDONGOS .....	138
FIGURA 50 -	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DA MANOGALACTANA (PEIsR) DERIVADA DO CALDO DE CULTIVO DE <i>P. sajor-caju</i> SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS .....	140
FIGURA 51 -	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DA $\beta$ -D-GLUCANA (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)- LIGADA (GHW) DERIVADA DOS CORPOS FRUTÍFEROS DE <i>P.</i> <i>sajor-caju</i> SOBRE O NÚMERO DE CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS POR ÁCIDO ACÉTICO EM CAMUNDONGOS .....	143
FIGURA 52 -	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DA $\beta$ -D-GLUCANA (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)- LIGADA (GHW) DERIVADA DOS CORPOS FRUTÍFEROS DE <i>P.</i> <i>sajor-caju</i> SOBRE O COMPORTAMENTO NOCICEPTIVO NA PRIMEIRA E SEGUNDA FASES DO TESTE DE FORMALINA EM CAMUNDONGOS .....	144
FIGURA 53 -	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DA $\beta$ -D-GLUCANA (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)- LIGADA (GHW) DERIVADA DOS CORPOS FRUTÍFEROS DE <i>P.</i> <i>sajor-caju</i> SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS .....	146
FIGURA 54 -	EXPRESSÃO RELATIVA DOS NÍVEIS DE mRNA PARA OS GENES DE IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ E COX-2 APÓS TRATAMENTO DE MACRÓFAGOS THP-1 COM G-PHW POR 3 E 6 HORAS.....	147
FIGURA 55 -	EXPRESSÃO RELATIVA DOS NÍVEIS DE mRNA PARA OS GENES DE IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ E COX-2 APÓS TRATAMENTO DE MACRÓFAGOS THP-1 COM LPS + G-PHW POR 3 E 6 HORAS .....	148

FIGURA 56 - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DA $\beta$ -D-GLUCANA (1→3)-LIGADA (G-PHW) DERIVADA DOS CORPOS FRUTÍFEROS DE <i>P. sajor-caju</i> SOBRE O COMPORTAMENTO NOCICEPTIVO NA PRIMEIRA E SEGUNDA FASES DO TESTE DE FORMALINA EM CAMUNDONGOS .....	151
FIGURA 57 - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DA $\beta$ -D-GLUCANA (1→3)-LIGADA (G-PHW) DERIVADA DOS CORPOS FRUTÍFEROS DE <i>P. sajor-caju</i> SOBRE O NÚMERO TOTAL DE LEUCÓCITOS (A) E CONCENTRAÇÃO DE MIELOPEROXIDASE (B) INDUZIDA POR LPS EM CAMUNDONGOS .....	153

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – POLISSACARÍDEOS ISOLADOS DE CORPOS FRUTÍFEROS PERTENCENTES AO GÊNERO <i>Pleurotus</i> .....	50
TABELA 2 – ATIVIDADE BIOLÓGICA DE POLISSACARÍDEOS ISOLADOS DO GÊNERO <i>Pleurotus</i> .....	55
TABELA 3 - ASSINALAMENTOS DE $^{13}\text{C}$ E $^1\text{H}$ DA MANOGALACTANA (PEIsR) ISOLADA DO CALDO DE CULTIVO DE <i>P. sajor-caju</i> .....	102
TABELA4- RESULTADOS DAS ANÁLISES DE COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS MANOGALACTANAS DERIVADAS DE CALDO DE CULTIVO (PEIsR), DA BIOMASSA MICELIAL (SE-SICW) E DE CORPOS FRUTÍFEROS (U100E-SCW) DE <i>P. sajor-caju</i> E DE CORPOS FRUTÍFEROS DE <i>P. ostreatoroseus</i> , <i>P. ostreatus</i> “florida” e <i>P. pulmonarius</i> . ....	108
TABELA 5 - ASSINALAMENTOS DE $^{13}\text{C}$ E $^1\text{H}$ DA FRAÇÃO GEL (GHW) ISOLADA DOS CORPOS FRUTÍFEROS DE <i>P. sajor-caju</i> .....	114
TABELA 6 - ASSINALAMENTOS DE $^{13}\text{C}$ E $^1\text{H}$ DA FRAÇÃO U100R-SHW ISOLADA DOS CORPOS FRUTÍFEROS DE <i>P. sajor-caju</i> .....	119
TABELA 7 - RESULTADOS DOS DERIVADOS PARCIALMENTE METILADOS DAS FRAÇÕES GHW E U100R-SHW DE CORPOS FRUTÍFEROS e M-U3SHW DA BIOMASSA MICELIAL DE <i>P. sajor-caju</i> .....	128
QUADRO 1 – POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS E CARACTERIZADOS DOS CORPOS FRUTÍFEROS, DA BIOMASSA MICELIAL E DO CALDO DE CULTIVO DE <i>P. sajor-caju</i> .....	134

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	32
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	35
2.1	FUNGOS BASIDIOMICETOS .....	35
2.2	GÊNERO <i>Pleurotus</i> .....	39
2.2.1	Formas de cultivo.....	39
2.2.2	Valor nutricional .....	45
2.3	POLISSACARÍDEOS FÚNGICOS .....	47
2.4	ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE EXTRATOS DE POLISSACARÍDEOS ISOLADOS DE FUNGOS DO GÊNERO <i>Pleurotus</i> .....	55
3	JUSTIFICATIVA.....	66
4	OBJETIVOS.....	68
4.1	OBJETIVO GERAL.....	68
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	68
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	69
5.1	METAS.....	69
5.2	MICRO-ORGANISMO E MANUTENÇÃO .....	70
5.3	PRODUÇÃO DE CORPOS FRUTÍFEROS .....	70
5.3.1	Produção de inóculo .....	70
5.3.2	Preparação e inoculação do substrato.....	72
5.3.3	Desenvolvimento de corpos frutíferos.....	73
5.4	PRODUÇÃO DE BIOMASSA MICELIAL E CALDO DE CULTIVO EM BIORREATOR.....	75
5.4.1	Preparo de inóculo.....	75

5.4.2	Cultivo submerso em biorreator .....	75
5.4.3	Avaliação da cinética do processo produtivo .....	77
5.5	EXTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS.....	78
5.5.1	Polissacarídeos dos corpos frutíferos e da biomassa micelial .....	79
5.5.1.1	Deslipidificação .....	79
5.5.1.2	Extração aquosa.....	80
5.5.1.3	Extração alcalina.....	81
5.5.2	Polissacarídeos do caldo de cultivo (exopolissacarídeos) .....	81
5.6	FRACIONAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS ...	82
5.6.1	Congelamento e descongelamento .....	82
5.6.2	Separação utilizando membranas com diferentes limites de exclusão .....	83
5.7	ANÁLISE ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS ISOLADOS ....	83
5.7.1	Composição monossacarídica .....	83
5.7.2	Metilação.....	84
5.7.3	Degradação controlada de Smith.....	85
5.7.4	Teste de homogeneidade e determinação da massa molar .....	85
5.8	MÉTODOS ANALÍTICOS .....	86
5.8.1	Cromatografia líquido-gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-EM) .....	86
5.8.2	Ressonância magnética nuclear (RMN).....	87
5.9	ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS POLISSACARÍDEOS CARACTERIZADOS ESTRUTURALMENTE .....	87
5.9.1	Soluções de tratamento .....	87
5.9.2	Animais .....	88
5.9.3	Avaliação da atividade antinociceptiva.....	88
5.9.3.1	Teste de contorções abdominais.....	88

5.9.3.2	Teste de formalina.....	89
5.9.4	Avaliação da atividade anti-inflamatória.....	90
5.9.5	Cultivo celular .....	91
5.9.6	Diferenciação e estimulação dos macrófagos.....	91
5.9.7	Cinética da expressão de gene por PCR em tempo real .....	92
5.9.8	Peritonite induzida por injeção intraperitoneal de LPS (lipopolissacarídeo bacteriano).....	93
5.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	94
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	95
6.1	CINÉTICA DO PROCESSO FERMENTATIVO PARA O CULTIVO SUBMERSO .....	95
6.2	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS.....	98
6.2.1	Manogalactana .....	98
6.2.2	Glucanas.....	111
6.2.2.1	Glucana (1→3), (1→6)-ligada.....	111
6.2.2.2	Glucana (1→3)-ligada.....	128
6.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS POLISSACARÍDEOS CARACTERIZADOS ESTRUTURALMENTE .....	135
6.3.1	Manogalactana .....	135
6.3.2	β-D-glucana (1→3),(1→6)-ligada.....	142
6.3.3	β-D-glucana (1→3)-ligada.....	146
6.3.3.1	Ensaio <i>in vitro</i> .....	146
6.3.3.2	Ensaio <i>in vivo</i> .....	150
6.3.4	Comparação da atividade biológica entre os polissacarídeos testados.....	154
7	CONCLUSÕES.....	155

8	REFERÊNCIAS .....	157
	Anexos.....	179



# 1 INTRODUÇÃO

Os cogumelos despertam o interesse de vários pesquisadores devido à sua facilidade de cultivo, ao seu elevado valor gastronômico e à possibilidade de extração de aromas, enzimas, lipídeos, polissacarídeos e também de metabólitos secundários importantes. Apresentam grande potencial em bioprocessos, sendo utilizados na área alimentícia (gastronômica), na área farmacêutica (ácidos orgânicos, enzimas, compostos biologicamente ativos) e na área ambiental (decomposição de resíduos orgânicos, na remoção de cor de efluentes têxteis) (DUFOSSE *et al.*, 2014; GIAVASIS, 2014). Segundo Wasser (2015), os cogumelos podem ser utilizados como alimentos e ainda serem produtores de moléculas que podem ser utilizadas como suplementos alimentares, agentes naturais de controle biológico para plantas (inseticida, fungicida, bactericida, herbicida), medicamentos e uso em cosméticos.

Em livros de medicina tradicional do Oriente, foi relatado a utilização dos cogumelos como agentes farmacológicos. Segundo El-Enshasy e Katti-Kaul (2013) os cogumelos são fontes naturais interessantes para a obtenção de compostos para aplicação farmacêutica, devido à grande variedade de componentes em relação a outras fontes naturais. Apresentam-se como uma fonte de polissacarídeos e complexo proteína-polissacarídeo com propriedades antitumoral e imunoestimulatório (WASSER, 2015). Atualmente, têm sido classificados como um alimento funcional, devido a sua capacidade de promover, prevenir ou tratar algumas doenças, como doenças cardiovasculares (GUILLAMÓN *et al.*, 2010), câncer, inflamação (PATEL *et al.*, 2012), doenças hepáticas (SYED e NAMDEO, 2014).

Alguns dos agentes responsáveis pela atividade farmacológica dos cogumelos são os polissacarídeos, que são extraídos dos corpos frutíferos (cogumelos). Estes polissacarídeos tem sido foco de atenção na área biomédica devido ao potencial terapêutico e a relativa baixa toxicidade (SCHEPETKIN e QUINN, 2006). Dentre os efeitos biológicos apresentados por estes polímeros pode-se citar atividades

antimicrobiana, antimutagênica, antiviral, antitrombótica, hipotensiva, antioxidante, antitumoral, antinociceptiva, anti-inflamatória, sendo classicamente reconhecidos como ativadores do sistema imunológico (MANTOVANI *et al.*, 2008; ROUPAS *et al.*, 2012).

As atividades farmacológicas dos polissacarídeos fúngicos estão relacionadas com sua estrutura (DABA e EZERONYE, 2003; MORADALI *et al.*, 2007; GIAVASIS, 2014). Espécies diferentes de fungos podem produzir polissacarídeos com unidades monossacarídicas, ligações glicosídicas, grau de ramificação e posição de ramificações diferentes, podendo resultar em atividades farmacológicas diferenciadas (YOSHIOKA *et al.*, 1985, NOSÁL'OVÁ *et al.*, 2001, TONG *et al.*, 2009, SYNYTSYA *et al.*, 2009).

A indústria farmacêutica tem utilizado fontes naturais para a produção de medicamentos durante séculos (WASSER, 2015) e, cerca de metade dos medicamentos em uso hoje são derivados de produtos naturais. No entanto, o cuidado com abordagens multidisciplinares, juntamente com a padronização e caracterização de produtos naturais são fundamentais para o desenvolvimento de novos e promissores medicamentos (SYED e NAMDEO, 2014). Para a produção industrial de medicamentos, a indústria farmacêutica também deve observar as normas de boas práticas de fabricação (BPF) para substâncias farmacêuticas ativas (APIs) e ter uma produção contínua e de qualidade padronizada (EL-ENSHASY e HATTI-KAUL, 2013; DEEPALAKSHMI e MIRUNALINI, 2014).

Para o cultivo de cogumelos (tradicionalmente chamado de cultivo sólido) em escala industrial algumas dificuldades se apresentam, pois trata-se de um sistema de cultivo aberto que necessita de um grande espaço, apresenta variação na qualidade do substrato utilizado para a formação dos cogumelos, nos parâmetros de produção e no controle do processo de produção (EL-ENSHASY e HATTI-KAUL, 2013). Outra possibilidade de cultivo destes fungos é o cultivo submerso (WISBECK, 2003, GERN *et al.*, 2008), já conhecido pela indústria farmacêutica em função da produção de vários antibióticos por este processo (LIMA *et al.*, 2001), que oferece um processo controlado, em condições assépticas e reprodutível. Pelo cultivo submerso há a formação da biomassa micelial e do caldo de cultivo (CARLILE e WATKINSON, 1996), mas não é possível a formação de corpos frutíferos (cogumelos).

São escassos os relatos em literatura sobre os polissacarídeos obtidos por cultivo submerso e sua comparação com os presentes nos corpos frutíferos. Assim, este trabalho caracterizou os polissacarídeos presentes na biomassa micelial e no caldo de cultivo, obtidos de cultivo submerso de *Pleurotus sajor-caju*, e também caracterizou os polissacarídeos presentes nos corpos frutíferos, obtidos de cultivo sólido de *P. sajor-caju*, na intenção de comparar as estruturas purificadas e caracterizadas. Como a atividade biológica é dependente da estrutura destes polímeros, experimentos biológicos foram realizados para verificar o potencial farmacológico dos polissacarídeos purificados.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 FUNGOS BASIDIOMICETOS

Em 1969, o ecologista norte-americano Robert H. Whittaker estabeleceu uma divisão para os seres vivos em cinco reinos, em função do modo de nutrição destes seres, separando-os nos reinos *Monera*, *Protista*, *Plantae*, *Animalia* e *Fungi* (TORTORA *et al.*, 2005). Em 1990, o microbiologista Carl Woese propôs a criação de um novo nível taxonômico acima dos reinos, denominado domínio, separando os seres vivos através de comparações entre as sequências de RNA ribossomal, estabelecendo três domínios: *Eubacteria*, *Archaea* e *Eucarya*, sendo o reino *Fungi* pertencente a este último domínio (WOESE *et al.*, 1990). No reino *Fungi* estão presentes os filós *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota* e *Basidiomycota*, sendo este último filo dividido em 3 classes: *Teliomycetes*, *Ustomycetes* e *Basidiomycetes* (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996; RAVEN *et al.*, 2007).

Os basidiomicetos são heterotróficos, isto é, absorvem seus nutrientes por degradação de matéria orgânica geralmente complexa e insolúvel (celulose, lignina, etc.), utilizando os compostos degradados como fonte de carbono, nitrogênio e energia (BREENE, 1990; PUTZKE e PUTZKE, 1998; PRESCOTT *et al.*, 2002). A digestão dos nutrientes necessários ao desenvolvimento dos basidiomicetos é realizada por enzimas hidrolíticas, que são secretadas sobre a matéria orgânica, gerando substâncias simples que podem ser absorvidas. Enzimas como celulasas, lignina peroxidase, lacase, manganês peroxidase, fenoloxidasas, entre outras, compõem o chamado complexo lignocelulolítico. Após a atuação enzimática, células especializadas, denominadas de haustórios, absorvem os produtos solúveis (BUSWELL e ODIER, 1987; PRESCOTT *et al.*, 2002).

São fungos pluricelulares formados por filamentos entrelaçados chamados de hifas (estruturas somáticas), que se alongam por crescimento apical. As hifas podem ser cenocíticas, apresentando vários núcleos dispersos em um único citoplasma, ou serem septadas (FIGURA 1A), apresentando septos que dividem o citoplasma em compartimentos com um ou mais núcleos (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996). As hifas se

ramificam em todas as direções, estendendo-se sobre ou dentro de qualquer substrato que os fungos utilizem como alimento. Ao conjunto de hifas dá-se o nome de micélio (FIGURA 1B) (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004).

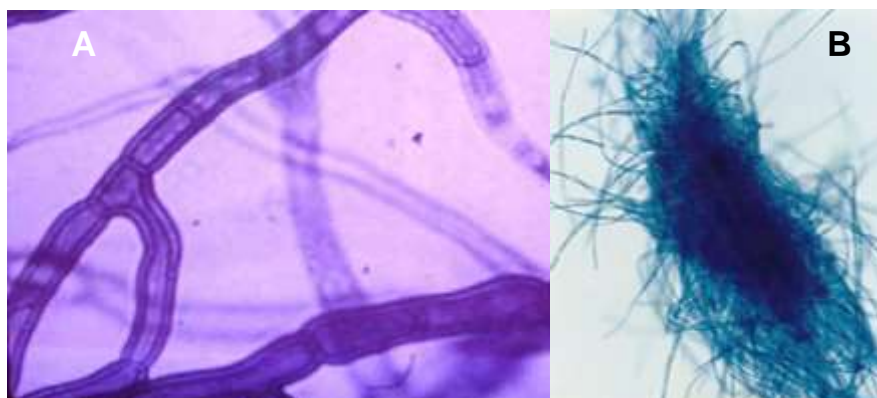


FIGURA 1 – HIFAS SEPTADAS (A) E MICÉLIO (B) DE FUNGOS PLURICELULARES.

Fontes: (A) <http://www.microbiologia.vet.br/ImagensMicologia.htm>; Acessado em 10/11/14.

(B) <http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=187>. Acessado em 10/11/14.

O ciclo de vida dos fungos envolve tanto a reprodução assexuada quanto sexuada (FIGURA 2). A reprodução assexuada pode acontecer por fragmentação das hifas; por fissão de células somáticas em células-filhas; por gemação de células somáticas e por fusão de hifas haplóides. As estruturas de reprodução sexuada são diferenciadas das estruturas somáticas (hifas) e exibem uma variedade de formas, sendo estas utilizadas para as classificações dos fungos (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996). O sub-filo *Basidiomycetes*, apresenta como característica que o diferencia dos outros sub-filos, a produção de basídios, que produzem basidiósporos (esporos sexuais), sendo este o principal meio de reprodução nos basidiomicetos (RAVEN *et al.*, 2007).

A reprodução sexuada inicia quando um basídio libera seus basidiósporos, que se dispersam e germinam no solo para a produção de hifas haplóides. Quando duas hifas haplóides se encontram ocorre uma fusão, formando um micélio dicariótico (plasmogamia). Este micélio dicariótico é estimulado a desenvolver o basidiocarpo (corpo frutífero), que possui em suas lamelas vários basídios. Nos basídios, os núcleos se fundem constituindo um núcleo diplóide que, por meiose, forma quatro

núcleos haplóides, que formarão quatro novos basidiósporos, que serão liberados, reiniciando o ciclo (FIGURA 2) (PRESCOTT *et al.*, 2002).

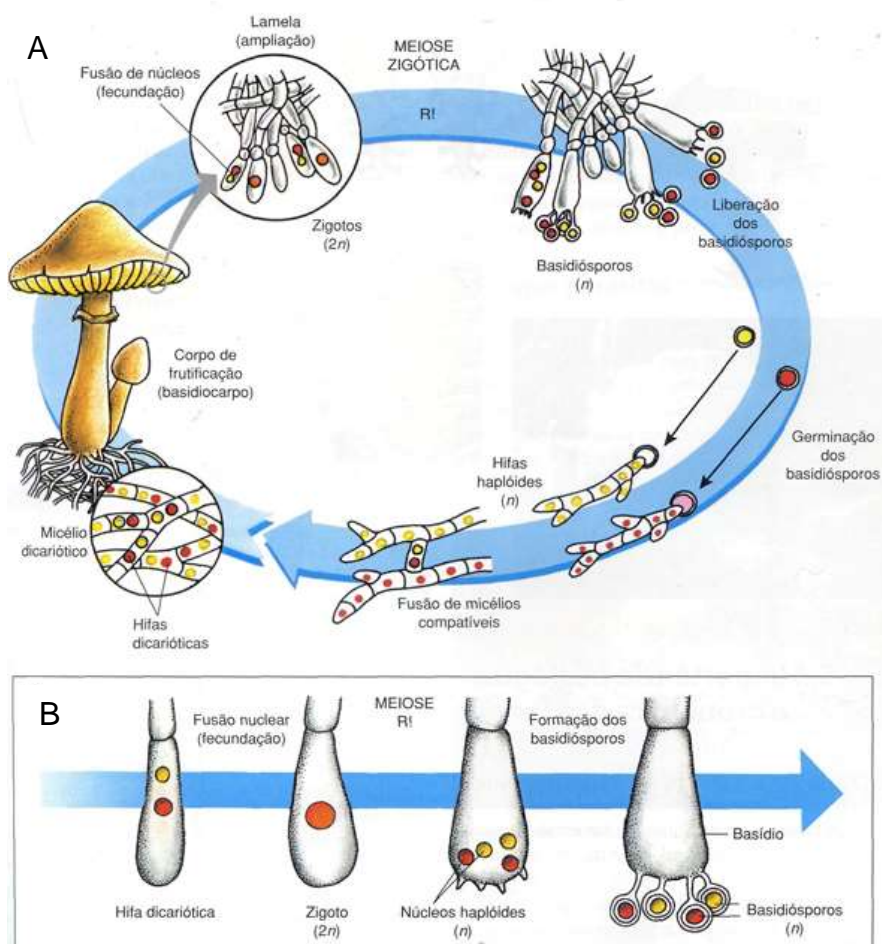


FIGURA 2 – CICLO DE REPRODUÇÃO DOS BASIDIOMICETOS.

Fonte: <http://11biogeogondomar.blogspot.com.br/2011/01/ciclo-sexual-em-basidiomicetos.html>

A- reprodução sexuada; B – reprodução assexuada

O micélio dicariótico pode diferenciar e formar uma estrutura macroscópica chamada de basidiocarpo, basidioma, corpo frutífero, ou popularmente conhecido como cogumelo (CHANG e MILES, 1993). Os cogumelos apresentam consistência frágil, morfologia e cores bastante variáveis (URBEN e OLIVEIRA, 1998).

O corpo frutífero é dividido em píleo, lamelas, anel, estipe e bulbo (PUTZKE e PUTZKE, 1998), conforme representados na Figura 3.

Os basidiomicetos são conhecidos por serem eficientes na degradação de lignina, sendo capazes de crescer em troncos de árvores vivas e mortas, principalmente em florestas de clima temperado (GUNDE-CIMERMAN, 1999).

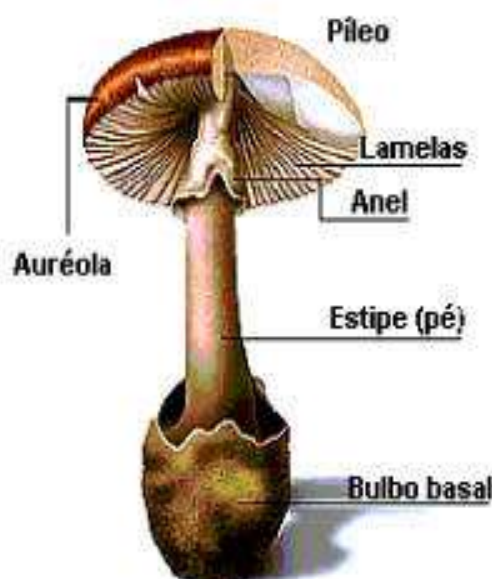


FIGURA 3 – DESENHO ESQUEMÁTICO DAS PRINCIPAIS ESTRUTURAS DE UM BASIDIOMICETO.

Fonte: <http://micologiananet.blogspot.com/2010/06/basidiomicetos.html>

São reconhecidos por seu excelente valor nutricional, pois possuem aminoácidos essenciais, proteínas, ácidos graxos insaturados, carboidratos, vitaminas do complexo B, ácido fólico, potássio, fósforo e ferro disponível (MANZI e PIZZOFRATO, 2000; BONATTI *et al.*, 2004; RAMPINELLI *et al.*, 2010).

Podem ser utilizados para a produção de corantes, aromas, ácidos orgânicos, polissacarídeos, enzimas, lipídios, vitaminas, aminoácidos essenciais, entre outros. Também podem atuar como agentes de tratamentos de resíduos e biodegradação, também para controle de pragas e insetos na agricultura (HESSELTINE, 1987; LORENZEN e ANKE, 1998; ESPOSITO e AZEVEDO, 2004; DUFOSSÉ *et al.*, 2014).

Merecem destaque os cogumelos comestíveis cultivados comercialmente, *Agaricus bisporus* (champignon), *Boletus edulis* (fungi), *Lentinula edodes* (Shiitake) e *Pleurotus* spp (hiratake e shimeji) (WEBSTER e WEBER, 2007).

## 2.2 GÊNERO *Pleurotus*

*Pleurotus* são cogumelos comestíveis, pertencentes aos basidiomicetos, com formato do píleo semelhante a uma concha e estipe excêntrica ou lateral, chamados comumente de cogumelos ostra (CHANG e MILES, 2004). Sua coloração pode variar entre azul-escuro, cinza-escuro, branco, creme, marrom, amarelo e rosa.

Várias espécies de cogumelos do gênero *Pleurotus* são cultivadas comercialmente no mundo. No Brasil, segundo a Associação Nacional de Produtores de Cogumelos (ANPC, 2014), as espécies cultivadas são *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus djamor*, *Pleurotus citrinopileatus*, *Pleurotus ostreatoroseus*, *Pleurotus eryngii* e *Pleurotus pulmonarius* (FIGURA 4).

### 2.2.1 Formas de cultivo

Fungos do gênero *Pleurotus* são de fácil cultivo, crescendo em resíduos agroindustriais e agroflorestais como substrato, agregando valor a estes resíduos (DIAS *et al.*, 2003; BONATTI *et al.*, 2004; CASTRO *et al.*, 2004; MODA *et al.*, 2005; FAN *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2007; MOONMOON *et al.*, 2010). Seu cultivo envolve várias etapas de processo, que foram descritas por BONATTI (2001) (FIGURA 5).



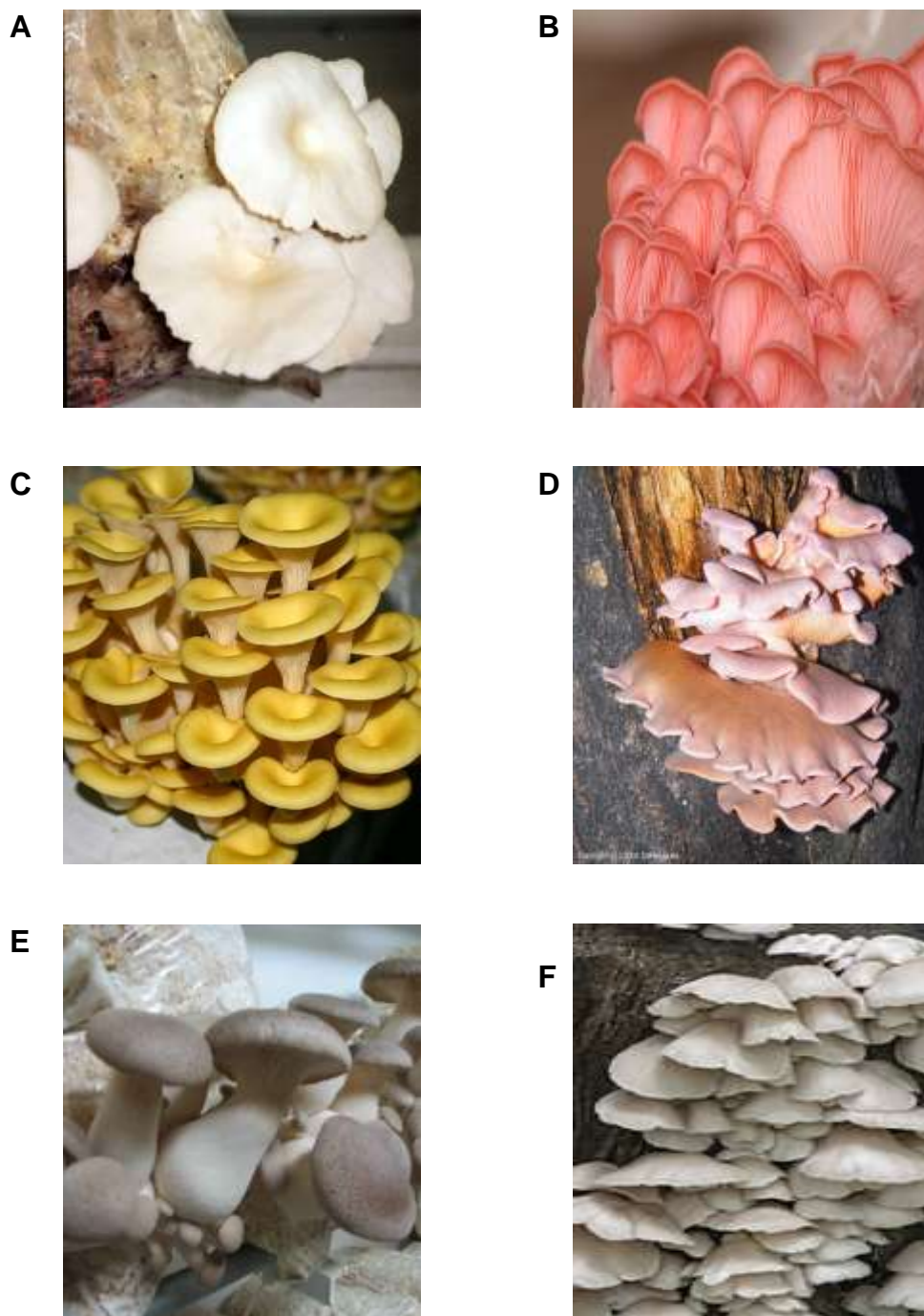


FIGURA 4 – ESPÉCIES DE *Pleurotus ostreatus* (A), *Pleurotus djamor* (B), *Pleurotus citrinopileatus* (C), *Pleurotus ostreatoroseus* (D), *Pleurotus eryngii* (E), *Pleurotus pulmonarius* (F).

Fonte: O autor (A); [www.oysterspaw.com](http://www.oysterspaw.com) (B); [www.huby.sk](http://www.huby.sk) (C); <http://www.mycodb.fr> (D); [http://www.lecoprin.ca/Culture\\_en.htm](http://www.lecoprin.ca/Culture_en.htm) (E); [http://calphotos.berkeley.edu/cgi/img\\_query?where-taxon=Pleurotus+pulmonarius&where-photographer=Dr.+Nick+V.+Kurzenko](http://calphotos.berkeley.edu/cgi/img_query?where-taxon=Pleurotus+pulmonarius&where-photographer=Dr.+Nick+V.+Kurzenko) (F).

A palha de trigo e de arroz, resíduos de algodão, bagaço de cana-de-açúcar, serragens, polpa e casca de frutas, folha de bananeira, polpa de café, entre outros, são utilizados como substrato para a produção de corpos frutíferos de fungos (EIRA, 2004).

O desenvolvimento dos primórdios (início da formação do corpo frutífero) e dos corpos frutíferos de *Pleurotus* dependem de fatores como o controle de temperatura, de umidade e de luz, e variam para cada espécie. Outro fator importante tanto para a formação dos primórdios quanto para o desenvolvimento dos corpos frutíferos é a composição do ar, especialmente o conteúdo de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> (BISARIA e MADAN, 1983; ZADRAZIL e KURTZMAN, 1984, ZADRAZIL e REINIGER, 1988; MARTIN, 1992; YILDIZ *et al.*, 1998 RAJARATHNAM *et al.*, 1998). Assim, a cabine de propagação e a câmara de cultivo devem ser projetadas para propiciar as melhores condições de desenvolvimento de primórdios e de corpos de frutificação.

Silveira *et al.* (2008) estudaram a influência da fração (concentração) de inóculo para a formação de corpos frutíferos de *Pleurotus ostreatus* e utilizaram uma câmara de cultivo com temperatura de 27 °C, umidade relativa do ar em 88% e fotoperíodo de 12 horas. Daba *et al.* (2008) estudaram a influência da temperatura sobre a produção dos corpos frutíferos de *Pleurotus ostreatus* no Egito e utilizaram condições semelhantes para umidade (80%), concluindo que a melhor temperatura é de 27 °C. Oseni *et al.* (2012) utilizaram dois métodos para a preparação do substrato (bagaço de cana-de-açúcar) para formação de corpos frutíferos de *Pleurotus ostreatus*, esterilização em autoclave e pasteurização a 60 °C. O desenvolvimento dos corpos frutíferos foi realizado em câmara de crescimento com temperatura entre 28–30 °C e 85–95% de umidade relativa do ar. Para o método que utilizou esterilização em autoclave houve colonização do substrato em um tempo menor (36 dias) em relação ao método de pasteurização (64 dias). Porém, não foi observado diferença significativa quando foi analisado o rendimento e eficiência biológica na obtenção de corpos frutíferos.

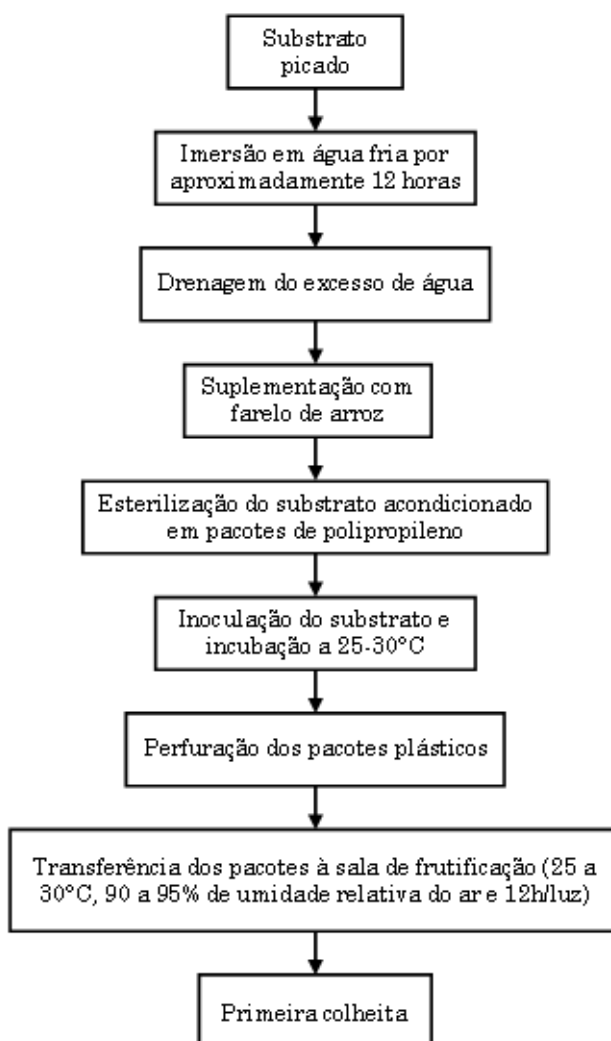


FIGURA 5 - ETAPAS DO PROCESSO DE CULTIVO DE *Pleurotus*.

Fonte: Bonatti (2001).

A produção de corpos frutíferos para aplicações medicinais deve estar em conformidade com as boas práticas de fabricação (BPF) para substâncias farmacêuticas ativas (APIs) e ter uma produção contínua e de qualidade padronizada (EL-ENSHASY e HATTI-KAUL, 2013; DEEPALAKSHMI e MIRUNALINI, 2014). Para o cultivo sólido existem alguns desafios para atingir estas normas, pois trata-se de um sistema de cultivo aberto, que apresenta variação na qualidade do material do substrato, nos parâmetros de cultivo e na produção controlada do corpo frutífero desejado (EL-ENSHASY e HATTI-KAUL, 2013). Outro sistema de produção de *Pleurotus*, que pode ser apropriado para a aplicação medicinal, é o seu cultivo por

fermentação submersa (WISBECK, 2003, GERN *et al.*, 2008). Neste sistema, há um controle total de todos os parâmetros de cultivo, que acontece sob condições totalmente estéreis, e um maior rendimento de metabólito ativo pode ser alcançado em um menor tempo (EL-ENSHASY e HATTI-KAUL, 2013).

Em biorreatores, pode-se produzir micélio de fungos de duas maneiras, sem agitação, chamado de cultivo de superfície, onde o meio fica estático formando um emaranhado de hifas na superfície do líquido (crescimento filamentoso) e outra, com agitação, chamado de cultivo submerso, onde o meio é agitado e o micélio fica submerso no meio (crescimento em “pellets”) (CARLILE e WATKINSON, 1996).

Sabendo-se que os fungos são organismos aeróbios, os processos de produção industrial implicam invariavelmente em aeração ou oxigenação do meio líquido (WAINWRIGHT, 1992).

Como os fungos são seres quimiorganotróficos, ou seja, necessitam de substâncias orgânicas como fonte de carbono e energia para o seu desenvolvimento. Os carboidratos são amplamente utilizados para o crescimento dos fungos, podendo variar de monossacarídeos (glucose, galactose, frutose, manose) a polissacarídeos (celulose, hemicelulose, quitina, inulina, etc). Não são fixadores de nitrogênio e, portanto, há a necessidade de se fornecer compostos contendo nitrogênio, tanto na forma inorgânica como orgânica. Geralmente, o sulfato de amônio (fonte inorgânica) ou extrato de levedura (fonte orgânica) são utilizados como fonte de nitrogênio em meio de cultivo para fungos (WALKER e WHITE, 2005).

Várias pesquisas já foram realizadas para identificar o melhor meio de cultivo para o crescimento do micélio do gênero *Pleurotus*, assim como, para a formação de polissacarídeos extracelulares ou exopolissacarídeos (EPS), ou seja, polissacarídeos que são sintetizados e secretados para o meio de cultivo (ROSADO *et al.*, 2003, GERN *et al.*, 2008; CONFORTIN *et al.*, 2008; EL-ENSHASY *et al.*, 2010; ASSIS *et al.*, 2013; BORGES *et al.*, 2014a).

A influência da concentração inicial de nitrogênio no meio de cultivo para a produção de exopolissacarídeo (EPS) foi analisada por Rosado *et al.* (2003), em frascos agitados, utilizando meio POL contendo 5,0 g L<sup>-1</sup> de sulfato de amônio. O cultivo apresentou concentrações de EPS de 5,8 g L<sup>-1</sup> para *P. ostreatoroseus* e

1,4 g L<sup>-1</sup> para *P. ostreatus* "florida", após 7 dias de incubação. Quando o meio foi preparado com menores concentrações de sulfato de amônio (2,5 g L<sup>-1</sup>), os autores observaram um aumento na concentração de EPS (9,7 g L<sup>-1</sup>) produzido por *P. ostreatoroseus* (ROSADO *et al.*, 2003).

Gern *et al.* (2008) avaliaram a influência de duas concentrações de glucose (20 e 40 g L<sup>-1</sup>) e três fontes de nitrogênio (extrato de levedura, água de maceração de milho e sulfato de amônio) sobre a produção de biomassa micelial e de polissacarídeos extracelulares por *P. ostreatus* em frascos agitados. Observaram que os melhores resultados, em termos de produtividade máxima em biomassa micelial (1,16 g L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>) e produtividade global em polissacarídeos (17,12 mg L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>), foram obtidos quando utilizou-se 5 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura e 40 g L<sup>-1</sup> de glucose. Em termos de concentração máxima de biomassa micelial, o melhor resultado (29,64 g L<sup>-1</sup>) foi obtido quando 20 g L<sup>-1</sup> de água de maceração de milho e 40 g L<sup>-1</sup> de glucose foram utilizados.

Confortin *et al.* (2008) observaram que uma redução na concentração de fonte de nitrogênio, formada por sulfato de amônio e extrato de levedura, apresentou maior produção de EPS por *P. sajor-caju* PS2001, atingindo concentração de 1,18 g L<sup>-1</sup>.

Buscando observar o efeito de uma fonte orgânica de nitrogênio, El-Enshasy *et al.* (2010) estudaram a produção de EPS por *P. ostreatus* em frascos agitados, utilizando extrato de levedura (2 g L<sup>-1</sup>) e peptona (2 g L<sup>-1</sup>), obtendo uma concentração máxima de EPS de 0,69 g L<sup>-1</sup> após 240 h de cultivo. Utilizando um biorreator com 9 L de volume de trabalho, a concentração de EPS aumentou para 1,12 g L<sup>-1</sup> após 216 h, mantendo-se constante até o final do cultivo (350 h).

A influência da concentração inicial de nitrogênio no meio de cultivo para a produção de exopolissacarídeo (EPS) por *P. sajor-caju* foi avaliada por Assis *et al.* (2013), em frascos agitados. A concentração mais elevada de EPS (0,6 g L<sup>-1</sup>) foi obtida quando utilizou-se meio contendo 2,5, 1,0, e 1,0 g L<sup>-1</sup> de sulfato de amônio, extrato de levedura e peptona de soja, respectivamente. Em biorreator foi observado que o uso deste meio, associado a 1,0 g L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub>, 20 g L<sup>-1</sup> de concentração de glucose inicial e valor de pH mantido em 4,0, proporcionou a maior produtividade em EPS (3,84 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>).

Além da composição do meio, a aeração, a agitação e o pH são parâmetros que interferem diretamente no cultivo (BARBOSA *et al.*, 2004).

Avaliando a influência da concentração inicial de glucose ( $40 \text{ g L}^{-1}$  e  $50 \text{ g L}^{-1}$ ) e do pH (3,0 e 4,0), por meio de um planejamento experimental  $2^2$ , sobre a síntese de EPS por *P. djamor*, Borges *et al.* (2014a) observaram que o aumento da concentração de glucose levou a um aumento no tempo de consumo do substrato, o qual refletiu negativamente nos valores de produtividade. Para pH, o inverso foi observado, valores menores de pH proporcionaram um aumento de concentração e na produtividade de EPS.

### 2.2.2 Valor nutricional

O gênero *Pleurotus* apresenta elevado valor nutricional (CRISAN e SANDS, 1978; GOGAVEKAR *et al.*, 2014), podendo fornecer um apoio significativo contra a alimentação com baixo valor nutricional (desnutrição) (DEEPALAKSHMI e MIRUNALINI, 2014).

*Pleurotus djamor* pode ser considerado fonte de fósforo e potássio, além de apresentar baixo teor de açúcar e de lipídios, e pode contribuir com o aporte de vitaminas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> (RAMPINELLI *et al.*, 2010). Corpos frutíferos de *P. sajor-caju* cultivados em casca de arroz apresentaram alto teor de potássio, cálcio, magnésio, ferro e manganês (GOGAVEKAR *et al.*, 2014).

Os corpos frutíferos da espécie *P. sajor-caju*, crescidos em folhas de bananeira, apresentaram valores (em base seca) de 43,0% de carboidratos totais, 18,4% de proteína bruta, 7,6% de fibra bruta, 5,1% de cinzas e 5,2% de lipídios (BONATTI *et al.*, 2004). Esta mesma espécie crescida em cascas de arroz apresentou valores (em base seca) de 63 % de carboidratos totais, 29,3% de proteínas, 12,3% fibra bruta, 6,8% de cinzas e 0,9% lipídios (GOGAVEKAR *et al.*, 2014).

Os corpos frutíferos de *P. ostreatus* crescidos em palha de arroz apresentaram composição nutricional de 50% de carboidratos, 24,5% de proteínas, 6% de cinzas, 5% de lipídios e 3% de fibras (DABA *et al.*, 2008). Outros resultados demonstraram que esta espécie apresenta 26,0 a 31,5% de proteínas, 20,9 a 33% de carboidratos totais e 2,0 a 5,9% de lipídios (RASHAD *et al.*, 2009). Em termos de lipídios, *P.*

*ostreatus* e *P. eryngii* apresentaram 17% de ácidos graxos saturados, 14% de monoinsaturados e 69 % de ácidos graxos poli-insaturados (REIS *et al.*, 2012).

*P. ostreatus* e *P. eryngii* apresentaram 161,1 e 71,7 mg g<sup>-1</sup> de aminoácidos, e 28,7 e 55,1 de mg g<sup>-1</sup> de mono e dissacarídeos, respectivamente (KIM *et al.*, 2009). Alanina, arginina, glicina, glutamina, cisteína, tirosina, serina, metionina e treonina são os principais aminoácidos encontrados em *P. ostreatus* (KIM *et al.*, 2009; KALAC, 2013).

Os teores de proteínas dos corpos frutíferos de *P. ostreatus* e *P. sajor-caju* são semelhantes aos encontrados em outros vegetais, como milho em conserva, palmito e batata branca (BONATTI *et al.*, 2004), e eles contêm proteínas com atividades biológicas, por exemplo, lectinas (KALAC, 2013).

Além de sua qualidade em proteínas e a presença de aminoácidos essenciais, os cogumelos são fontes de carboidratos (GUNDE-CIMERMAN, 1999).

Os corpos frutíferos das espécies *P. ostreatus* e *P. pulmonarius*, cultivados em resíduos de cana-de-açúcar, apresentaram valores de carboidratos de 53% e 42%, respectivamente (ORTEGA *et al.*, 1992).

Como já apresentado, os valores de carboidratos podem variar de 20 a 50% (BONATTI *et al.*, 2004; DABA *et al.*, 2008; RASHAD *et al.*, 2009) da massa seca do corpo frutífero, sendo a composição e a quantidade destes carboidratos diferentes entre as espécies e, até mesmo, entre linhagens da mesma espécie (PRESCOTT *et al.*, 2002; WALKER e WHITE, 2005; SILVA e COELHO, 2006; KALAC, 2013).

Os carboidratos estão distribuídos em toda a célula, com funções de geração e reserva de energia e estrutura celular. Como exemplos dos carboidratos presentes em cogumelos têm-se o manitol (álcool de manose), que participa do crescimento e firmeza dos corpos de frutificação; o glicogênio, que é o polissacarídeo de reserva energética; as  $\beta$ -D-glucanas, que são polissacarídeos estruturais juntamente com a quitina (KALAC, 2013; GOGAVEKAR *et al.*, 2014), sendo esta última presente no teor de 7,6 g kg<sup>-1</sup> e 31,6 g kg<sup>-1</sup> para *P. ostreatus* e *P. eryngii*, respectivamente (NITSCHKEA *et al.*, 2011). Gutiérrez *et al.* (1995) relatam que as glucanas podem contribuir para manter o pH ótimo, além de impedir a desidratação das hifas e regular a concentração de glucose extracelular.

## 2.3 POLISSACARÍDEOS FÚNGICOS

Os polissacarídeos representam uma classe de macromoléculas, com ampla ocorrência na natureza e com alta capacidade de carregar informações biológicas, devido a sua grande variabilidade estrutural (OOI e LIU, 2000). São formados por unidades monossacarídicas unidas entre si por ligações glicosídicas, podendo formar estruturas lineares ou ramificadas. Diferem na identidade de suas unidades monossacarídicas, nos tipos de ligação que os unem, no comprimento de suas cadeias e no seu grau de ramificação (NELSON e COX, 2011).

As unidades monoméricas são unidas por ligações glicosídicas que ocorrem entre o carbono anomérico de um hemiacetal (C-1) ou de um hemicetal (C-2) e um grupo hidroxila qualquer de outro monossacarídeo, que age como acceptor ou aglicona, apresentando uma conformação  $\alpha$  ou  $\beta$  dependendo da configuração do carbono anomérico em ligação (ASPINAL, 1982).

Os homopolissacarídeos contêm apenas um único tipo de unidade monomérica e recebem sua denominação de acordo com o monossacarídeo que os compõe, como por exemplo, glucana para um homopolissacarídeo de glucose e manana para um polissacarídeo formado por unidades de manose. Já os heteropolissacarídeos contêm dois ou mais tipos de monômeros e sua denominação depende de sua composição. No caso de uma cadeia principal composta de manose, contendo substituições de unidades de xilose, este polissacarídeo é denominado uma xilomanana (ASPINAL, 1982; NELSON e COX, 2011).

Os polissacarídeos constituem 75% da parede celular das hifas (GUTIÉRREZ *et al.*, 1995) que são quimicamente diferentes da parede celular encontrada em vegetais (MADIGAN *et al.*, 2004). Porém, sua função é semelhante, determinando o formato celular, a proteção física, fornecendo o suporte osmótico, além dos processos de sinalização celular, adesão e reprodução (FUKUDA *et al.*, 2009).

A parede celular dos fungos é uma estrutura complexa que, frequentemente, varia entre espécies de fungos (ADAMS, 2004). Ela é constituída por polissacarídeos como quitina,  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-ligada e polissacarídeos contendo mananas, além de proteínas, que podem estar associadas aos polissacarídeos ou à membrana plasmática (ADAMS, 2004; CHEN e SEVIOUR, 2007; LI *et al.*, 2012). A quitina e as



$\beta$ -glucanas são os polissacarídeos mais abundantes e os mais conservados através da evolução da parede celular fúngica (BARRETO-BERGTER e FIGUEIREDO, 2014).

A Figura 6 apresenta um modelo da parede celular do micélio de *Aspergillus fumigatus* (BEAUVAIS *et al.*, 2014). As galactomananas são componentes estruturais importantes na parede células de *Aspergillus*, sendo amplamente distribuída nesta espécie (BARRETO-BERGTER e FIGUEIREDO, 2014).

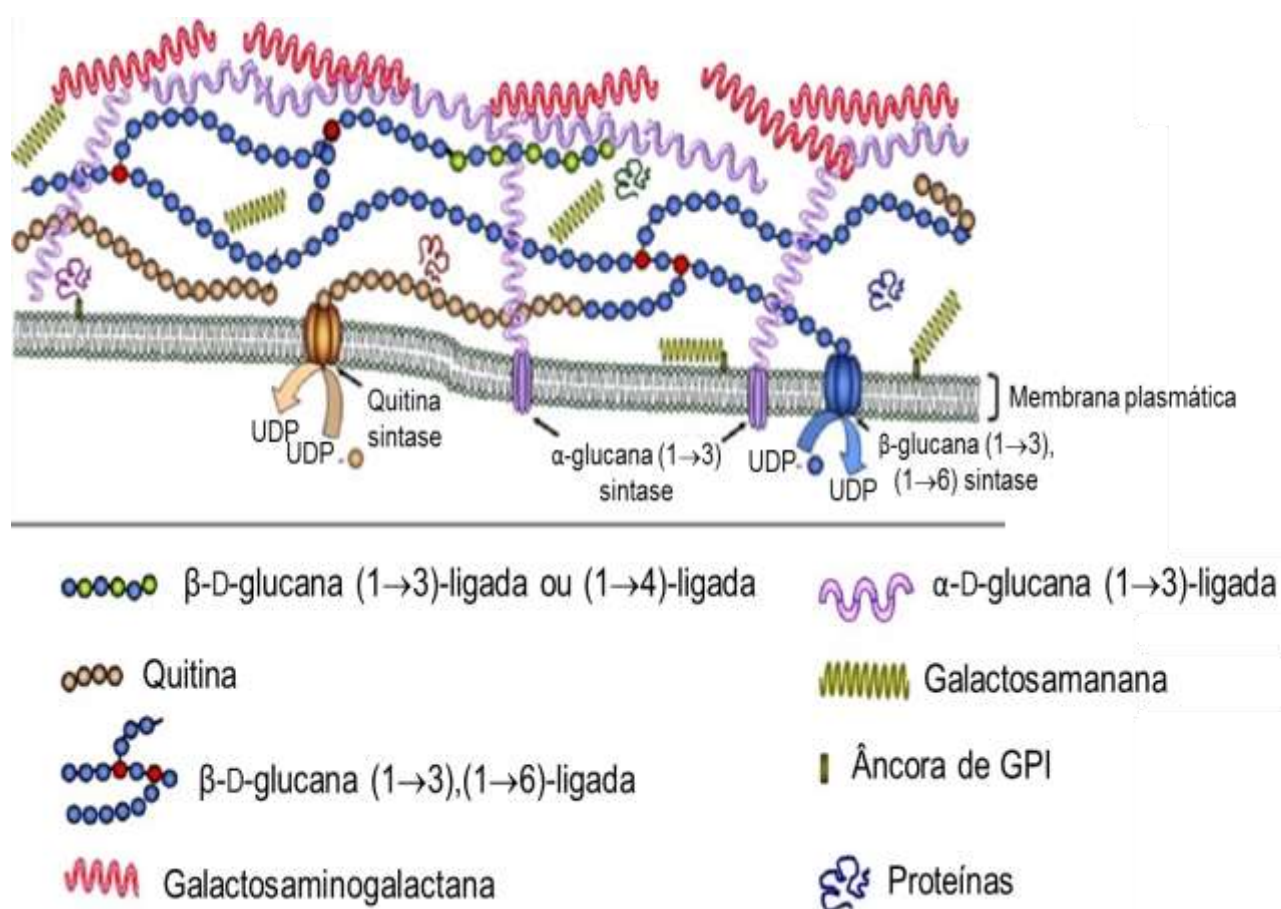


FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PAREDE CELULAR DE *Aspergillus fumigatus*.

Fonte: Adaptado de BEAUVAIS *et al.* (2014).

Segundo Chen e Cheung (2014), a parede celular de corpos frutíferos de *P. tuber-regium* contém quatro frações principais: uma fração externa de polissacarídeo e proteínas complexas, que podem ser extraídos com água fervente; uma fração solúvel em solução alcalina a frio formada por heteropolissacarídeos associados com uma pequena quantidade de proteínas; uma fração solúvel em solução alcalina a quente formada por  $\beta$ -D-glucanas (1 $\rightarrow$ 4)-ligadas substituídas em O-6 por  $\beta$ -D-glucose; e uma fração insolúvel em solução alcalina formada por um complexo glucana-quitina.

As glucanas são os polissacarídeos mais frequentes na parede celular dos fungos (RUTHES *et al.*, 2015) e são formadas por unidades de glucose, que se ligam umas às outras através de ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3),  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 6) ou  $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 3) e  $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 4) (DABA E EZERONYE, 2003).

Esses polissacarídeos podem ser lineares ou apresentar ramificações. Na maioria das vezes, ligações do tipo  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3) estão na cadeia principal, enquanto as ramificações são formadas por ligações  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 6) (WASSER, 2002). Para o gênero *Pleurotus*, as glucanas variam de 0,2 a 0,5% de corpos frutíferos secos, com fração de polissacarídeos solúvel de 16 a 38% e 62 a 83% de polissacarídeos insolúvel (MANZI e PIZZOFERRATO, 2000).

Na Tabela 1 estão apresentadas estruturas de polissacarídeos isolados de corpos frutíferos do gênero *Pleurotus*.

TABELA 1 – POLISSACARÍDEOS ISOLADOS DE CORPOS FRUTÍFEROS PERTENCENTES AO GÊNERO *Pleurotus*.

Cadeia Principal	Ramificação	Espécie	Autor
(1→6) α-D-Galp		<i>P. ostreatoroseus</i>	CARBONERO <i>et al.</i> (2008)
(1→6) 3-O-Me-α-D-Galp		<i>P. eryngii</i>	CARBONERO <i>et al.</i> (2008)
	O-2 e O-4 β-D-Manp	<i>P. eryngii</i>	ZHANG <i>et al.</i> (2013a)
	O-2 β-D-Manp	<i>P. ostreatus florida</i>	ROSADO <i>et al.</i> (2003)
	O-2 β-D-Manp	<i>P. ostreatoroseus</i>	ROSADO <i>et al.</i> (2003)
	O-2 β-D-Manp	<i>P. geesteranus</i>	ZHANG <i>et al.</i> (2013b)
	O-2 β-D-Manp	<i>P. pulmonarius</i>	SMIDERLE <i>et al.</i> (2008b)
(1→6) α-D-Galp	O-2 β-D-Glcp	<i>P. ostreatus</i>	SUN e LIU (2009)
(1→4) α-D-Glcp	O-2 β-D-Manp	<i>P. sajor-caju</i>	PRAMANIK <i>et al.</i> (2005)
(1→6) α-D-Galp			
(1→3) α-D-Glcp	O-3 e O-6 β-D-Glcp	<i>P. ostreatus florida</i>	SANTOS-NEVES <i>et al.</i> (2008a)
(1→3) α-D-Glcp		<i>P. eryngii</i>	SYNYTSYA <i>et al.</i> (2009)
		<i>P. ostreatus</i>	SYNYTSYA <i>et al.</i> (2009)
(1→3),(1→6) α-D-Glcp		<i>P. ostreatus</i>	PALACIOS <i>et al.</i> (2012)
(1→4) α-D-Glcp		<i>P. ostreatus</i>	PALACIOS <i>et al.</i> (2012)
(1→3) β-D-Glcp	O-4 α-D-Glcp	<i>P. florida var. blue</i>	DEY <i>et al.</i> (2012)
	O-6 β-D-Glcp	<i>P. pulmonarius</i>	SMIDERLE <i>et al.</i> (2008a)
	O-6 β-D-Glcp	<i>P. ostreatus florida</i>	SANTOS-NEVES <i>et al.</i> (2008b)
	O-6 β-D-Glcp	<i>P. eryngii</i>	CARBONERO <i>et al.</i> (2006)
	O-6 β-D-Glcp	<i>P. ostreatoroseus</i>	CARBONERO <i>et al.</i> (2006)
	O-6 β-D-Glcp	<i>P. sajor-caju</i>	CARBONERO <i>et al.</i> (2012)
	O-6 β-D-Glcp	<i>P. tuber-regium</i>	CHENGHUA <i>et al.</i> (2000)
(1→3),(1→6) β-D-Glcp		<i>P. eryngii</i>	SYNYTSYA <i>et al.</i> (2009)
		<i>P. ostreatus</i>	SYNYTSYA <i>et al.</i> (2009)
		<i>P. ostreatus</i>	PALACIOS <i>et al.</i> (2012)
(1→4) β-D-Glcp	O-3 e O-6 β-D-Glcp	<i>P. tuber-regium</i>	CHEN <i>et al.</i> (2014b)
	O-3 e O-6 β-D-Glcp	<i>P. tuber-regium</i>	CHEN <i>et al.</i> (2014a)
(1→6) β-D-Glcp	O-3 β-D-Glcp	<i>P. tuber-regium</i>	ZHANG <i>et al.</i> (2001)
		<i>P. florida var. blue</i>	DEY <i>et al.</i> (2012)
		<i>P. citrinopileatus</i>	LIU <i>et al.</i> (2012)

Manogalactanas (1→6)-ligadas, com substituição em O-3 por grupos metil em algumas unidades de α-D-Galp e ramificações em O-2 por terminais não-redutores de β-D-Manp, (FIGURA 7A) e as β-D-glucanas (1→3)-ligadas, com substituição em O-6

por terminais não-redutores de  $\beta$ -D-Glcp (FIGURA 7B) são encontradas em várias espécies de fungos do gênero *Pleurotus* (TABELA 1), demonstrando suas presenças marcantes na estrutura da parede celular das hifas.

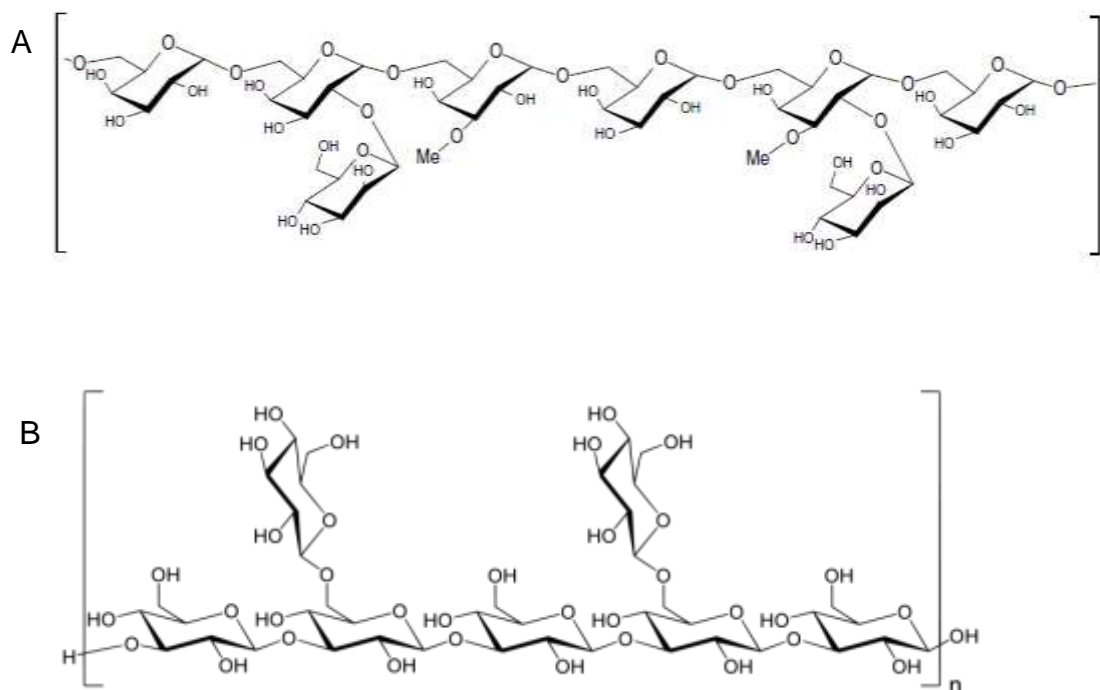


FIGURA 7 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DE UMA MANOGALACTANA (A) E  $\beta$ -D-GLUCANA (1→3),(1→6)-LIGADA (B) DE FUNGOS FILAMENTOSOS.

Fonte: Smiderle *et al.* (2008b) (A); Kozarski *et al.* (2014) (B).

Vários processos foram desenvolvidos para a extração de polissacarídeos de corpos frutíferos. Inicialmente é realizada a extração dos compostos apolares como lipídios, fenóis, terpenos, utilizando o refluxo de solventes orgânicos como etilester e acetona (ZHANG *et al.*, 2001), etilacetato e acetona (CHEN *et al.*, 2014a,b), etanol (80 a 95%) (CHENGHUA *et al.*, 2000; SYNYTSYA *et al.*, 2009; SUN e LIU, 2009; ZHANG *et al.*, 2013a,b), clorofórmio e metanol (CARBONERO *et al.*, 2006 e 2008, SMIDERLE *et al.*, 2008a,b, SANTOS-NEVES *et al.*, 2008a,b) e metanol (PALACIOS *et al.*, 2012).

Após a deslipidificação, são realizados os processos de extração dos polissacarídeos, utilizando como solvente tanto água em temperatura ambiente

(SMIDERLE *et al.*, 2008b; PALACIOS *et al.*, 2012) ou água quente (ROSADO *et al.*, 2003; PRAMANIK *et al.*, 2005; CARBONERO *et al.*, 2006, 2008 e 2012; SANTOS-NEVES *et al.*, 2008a; SMIDERLE *et al.*, 2008a; SUN e LIU, 2009; SYNYTSYA *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2012; PALACIOS *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2013a,b) quanto soluções alcalinas a frio (4 a 10 °C) (CHENGHUA *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2001; SYNYTSYA *et al.*, 2009, CHEN *et al.*, 2014a,b) ou a quente (ZHANG *et al.*, 2001; SANTOS-NEVES *et al.*, 2008b; DEY *et al.*, 2012; PALACIOS *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2014a,b). Os processos de extração promovem a remoção dos polissacarídeos do corpo frutífero juntamente com compostos de baixa massa molar (mono e dissacarídeos) e outros compostos solúveis nos solventes (proteínas) (PALACIOS *et al.*, 2012).

Para promover a separação dos polissacarídeos dos extratos aquosos ou extratos alcalinos, em geral utiliza-se etanol em excesso (de 3 até 10 vezes o volume do extrato) (ROSADO *et al.*, 2002; PRAMANIK *et al.*, 2005) como agente de precipitação. Esta precipitação acontece devido à ação do etanol sobre as pontes de hidrogênio que acontecem na interação do polissacarídeo com a água (NELSON e COX, 2011). A ruptura destas pontes de hidrogênio diminui a solubilidade dos polissacarídeos, promovendo a separação por precipitação.

Assim como os polissacarídeos, as proteínas também precipitam por ação do etanol. Então, vários autores propõem a remoção das proteínas do precipitado, sendo o método Sevag normalmente utilizado (CHENGHUA *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2001; SUN e LIU, 2009; SYNYTSYA *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2012). Esta precipitação também pode ser realizada com a adição de ácido tricloroacético (TCA) a 20% (PALACIOS *et al.*, 2012).

As etapas subsequentes estão voltadas para a purificação dos polissacarídeos obtidos que, devido a sua diversidade em função do tamanho e da solubilidade, gera uma grande diversidade de técnicas de purificação (RUTHES *et al.*, 2015).

Em função da característica de solubilidade dos polissacarídeos, pode-se citar as técnicas de congelamento e descongelamento, que promove a separação de frações solúveis e insolúveis em água fria (GORIN e IACOMINI, 1984; CARBONERO *et al.*, 2006, 2012; SANTOS-NEVES *et al.*, 2008 b; SMIDERLE *et al.*, 2008a), e o tratamento com solução de Fehling, que promove a separação de frações solúveis e

insolúveis em complexos de  $\text{Cu}^{2+}$  (ROSADO *et al.*, 2002, 2003; CARBONERO *et al.*, 2008; SANTOS-NEVES *et al.*, 2008 a; SMIDERLE *et al.*, 2008b).

Os polissacarídeos podem ser separados em função do tamanho molar, utilizando-se membranas de diálise, que separam por exclusão de tamanho pela força osmótica (gradiente de concentração) ou membranas de ultrafiltração, que separam polímeros por tamanho do poro da membrana (CHENGHUA *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2001; ROSADO *et al.*, 2003; PRAMANIK *et al.*, 2005; CARBONERO *et al.*, 2008; SANTOS-NEVES *et al.*, 2008 a; SMIDERLE *et al.*, 2008b; SYNITSYA *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2013b; CHEN *et al.*, 2014a,b; RUTHES *et al.*, 2015).

Pode-se ainda empregar a técnica de purificação por cromatografia de gel permeação em coluna, destacando-se o uso de géis de Sepharose 6B (PRAMANIK *et al.*, 2005, DEY *et al.*, 2012), DEAE-Sepharose CL-6B (SUN e LIU, 2009; ZHANG *et al.*, 2013a,b), Sephadex G-10, G-25, G-200, (LIU *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2014a,b), Sephacryl S-100, S-200, S-300, S-400, S-1000 (ZHANG *et al.*, 2013a,b; CHEN *et al.*, 2014a,b) para a purificação de polissacarídeos.

Todas estas técnicas podem ser utilizadas em sequência ou separadamente, dependendo da característica da estrutura polissacarídica em estudo.

Além do corpo frutífero, os polissacarídeos fúngicos podem ser isolados da biomassa micelial e do caldo de cultivo, quando o fungo é cultivado em meio líquido (cultivo submerso) (SUTHERLAND, 1998).

Rosado *et al.* (2002) isolaram polissacarídeos de caldo de cultivo de *P. ostreatoroseus*. O fungo foi cultivado em frascos de Erlenmeyer contendo 100 mL de meio POL, incubado com rotação de 143 rpm a 25 °C por 7 dias (ROSADO *et al.*, 2002). O caldo de cultivo foi separado por filtração, adicionado de acetona (3 volumes), e mantido a 4 °C por 24 horas. O precipitado formado foi separado por centrifugação e dialisado contra água. Este precipitado foi dissolvido em água a 100 °C e mantido por 3 horas. O extrato aquoso quente passou por processos de congelamento e descongelamento, precipitação com solução de Fehling e extração com dimetilsulfóxido. Estes processos resultaram na separação de duas frações purificadas, a fração A com cadeia principal formada por unidades de  $\alpha$ -D-manose (1 $\rightarrow$ 6)-ligada com substituição nas posições O-2 e O-3 também por unidades de  $\alpha$ -D-Manp, e a fração B2, um polissacarídeo linear formado por unidades de  $\alpha$ -D-galactose

(1→4)-ligada com algumas unidades substituídas em O-3 de por grupos metil, com massa molar de  $17 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$ .

Smiderle *et al.* (2012) cultivaram *P. pulmonarius* em frascos sob agitação por 18 dias com meio BD (batata dextrose) suplementado com extrato de levedura, fosfato de potássio e sulfato de magnésio, utilizando como fontes de carbono glucose, galactose, xilose e arabinose, separadamente. O meio com galactose como fonte de carbono foi o que apresentou a maior concentração de EPS ( $0,42 \text{ g L}^{-1}$ ), mas todos os meios apresentaram EPS constituído por unidades de manose, galactose e glucose, majoritariamente. Espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de  $^{13}\text{C}$  sugerem a presença de manogalactanas para os EPS obtidos de *P. pulmonarius* com fonte de carbono de galactose, xilose e arabinose.

Devi *et al.* (2013) estudaram um polissacarídeo presente no micélio de *P. ostreatus* crescido em meio BD por 21 dias. O micélio foi lavado com água destilada, moído e centrifugado. O resíduo da centrifugação foi adicionado de 2% de hidróxido de potássio (KOH) e mantido por 12 horas a  $4^\circ\text{C}$ . O extrato foi separado por centrifugação, neutralizado, precipitado com etanol, ressuspensão em solução de 20 mM de tampão TRIS e fracionado por coluna de cromatografia de troca iônica com gel DEAE-Sephadex, sendo posteriormente dialisado contra água em membrana de 12 kDa de tamanho de exclusão. A fração retida apresentou uma  $\beta$ -D-glucana (1→3),(1→6)-ligada, com presença de manose e fucose e algumas unidades de  $\alpha$ -D-glucose.

De acordo com Manzi e Pizzoferrato (2000)  $\beta$ -glucanas (1→3), (1→4) e/ou (1→6)-ligadas são responsáveis por algumas propriedades benéficas à saúde humana, como atividade imunomodulatória, antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral apresentadas por fungos comestíveis. A atividade biológica desempenhada pelos polissacarídeos fúngicos está associada a sua estrutura química (DABA e EZERONYE, 2003; MORADALI *et al.*, 2007, GIAVASIS, 2014). Assim, a identificação da estrutura química destas moléculas requer atenção, em especial os processos de purificação e caracterização, para relacioná-los a suas possíveis aplicações biológicas (RUTHES *et al.*, 2015).

## 2.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE EXTRATOS DE POLISSACARÍDEOS ISOLADOS DE FUNGOS DO GÊNERO *Pleurotus*

Diversas atividades biológicas foram relatadas para extratos de polissacarídicos e para polissacarídeos purificados isolados de fungos do gênero *Pleurotus* (TABELA 2).

De acordo com a Tabela 2, vários pesquisadores têm demonstrado que polissacarídeos isolados de fungos do gênero *Pleurotus* apresentam atividade antitumoral.

TABELA 2 – ATIVIDADE BIOLÓGICA DE POLISSACARÍDEOS ISOLADOS DO GÊNERO *Pleurotus*.

Efeito	Polissacarídeos	Espécie	Autor
Antitumoral	$\beta$ -glucanas	<i>P. ostreatus</i>	YOSHIOKA <i>et al.</i> (1985)
	$\beta$ -glucanas	<i>P. tuber-regium</i>	ZHANG <i>et al.</i> (2004a)
	$\beta$ -glucanas	<i>P. tuber-regium</i>	ZHANG <i>et al.</i> (2004b)
	$\alpha$ -glucanas	<i>P. ostreatus</i>	LAVI <i>et al.</i> (2006)
	$\beta$ -glucanas	<i>P. ostreatus</i>	TONG <i>et al.</i> (2009)
	$\beta$ -glucanas	<i>P. sajor-caju</i>	DALONSO <i>et al.</i> (2010)
	Extrato	<i>P. djamor</i>	DE BARBA <i>et al.</i> (2011)
	Manogalactana	<i>P. eryngii</i>	YANG <i>et al.</i> (2013)
	Extrato	<i>P. sajor-caju</i>	ASSIS <i>et al.</i> (2013)
	Extrato	<i>P. ostreatus</i>	FACCHINI <i>et al.</i> (2014)
Prebiótico	$\beta$ -glucanas e $\alpha$ -glucanas	<i>P. ostreatus</i>	SYNYTSYA <i>et al.</i> (2009)
	$\beta$ -glucanas e $\alpha$ -glucanas	<i>P. eryngii</i>	SYNYTSYA <i>et al.</i> (2009)
Anticolite	$\beta$ -glucanas	<i>P. ostreatus</i>	NOSÁL'OVÁ <i>et al.</i> (2001)
Gastroprotetor	Extrato	<i>P. ostreatus</i>	YANG <i>et al.</i> (2012)
Lipogênese e lipólise	Extrato	<i>P. sajor-caju</i>	KANAGASABAPATHY <i>et al.</i> (2014)
Hipoglicemiante	Extrato de EPS	<i>P. ferulae</i>	WANG <i>et al.</i> (2014)
Antinociceptivo	$\beta$ -glucanas	<i>P. pulmonarius</i>	SMIDERLE <i>et al.</i> (2008a)
	$\beta$ -glucanas	<i>P. pulmonarius</i>	BAGGIO <i>et al.</i> (2010)
	$\beta$ -glucanas	<i>P. pulmonarius</i>	BAGGIO <i>et al.</i> (2012)
Pró-inflamatório	$\beta$ -glucanas	<i>P. florida</i>	DEY <i>et al.</i> (2012)
	$\beta$ -glucanas	<i>P. sajor-caju</i>	CARBONERO <i>et al.</i> (2012)
Anti-inflamatório	Extrato	<i>P. florida</i>	IM <i>et al.</i> (2014)



Yoshioka *et al.* (1985) demonstraram que um tratamento por 10 dias com  $\beta$ -glucana (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-ligadas, isolada de *P. ostreatus*, promoveu a inibição do desenvolvimento do tumor Sarcoma 180 implantado em camundongos em 74% (0,1 mg kg<sup>-1</sup>) e 95% (0,2 mg kg<sup>-1</sup>), 5 semanas após a inoculação do tumor.

Polissacarídeos solúveis em água e carboximetilados (CMHAE), contendo a presença de  $\beta$ -glucanas (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-ligadas, isolados de corpos frutíferos de *P. tuber-regium*, com massa molar variando de  $2,08 \times 10^4$  a  $53,2 \times 10^4$  g mol<sup>-1</sup> apresentaram inibição de até 40% do desenvolvimento do tumor sarcoma 180, injetados em camundongos BALB/c. Também foi observado um aumento da produção de TNF- $\alpha$  no plasma sanguíneo após estímulo com lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) (ZHANG *et al.*, 2004a).

O LPS, um dos componentes principais da membrana externa de bactérias gram-negativas, é um potente estimulador de resposta imune inata e adquirida (SANTOS-OLIVEIRA *et al.*, 2011). Este lipopolissacarídeo é reconhecido pelo receptor de membrana *Toll-like* 4 (TLR4) das células do sistema imunológico, ativando a via de sinalização do fator de transcrição (NF- $\kappa$ B), gerando proteínas envolvidas na resposta inflamatória (CRUZ-MACHADO, 2010).

Em testes *in vitro*, CMHAE demonstraram inibição sobre o crescimento de células de leucemia HL-60, mas não apresentaram efeito sobre as células de câncer de fígado HepG2. Também promoveram maior inibição no desenvolvimento de Sarcoma 180 e demonstram maior produção de TNF- $\alpha$ , indicando a possível influência de mediação do TNF- $\alpha$  sobre o desenvolvimento tumoral (ZHANG *et al.*, 2004a).

Um polissacarídeo solúvel em água foi obtido de corpos frutíferos de *P. ostreatus* e caracterizado, apresentando como cadeia principal unidades de  $\beta$ -D-Glcp (1 $\rightarrow$ 3)-ligadas com ramificações ocasionais em O-6, compostas de glucose (1 $\rightarrow$ 3)-ligadas, galactose (1 $\rightarrow$ 4)-ligadas e manose (1 $\rightarrow$ 4)-ligadas, com terminais não-redutores de glucose e galactose (POPS-1). Ensaios de citotoxicidade demonstraram que o polissacarídeo POPS-1 apresentou 63% de inibição sobre a proliferação de células Hela, na dose de 200  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>, mas nenhum efeito antiproliferativo foi observado em células 293T de rim de embriões humanos (TONG *et al.*, 2009).

Extratos aquosos (água quente e solução de oxalato de amônio) de corpos frutíferos de *P. sajor-caju* foram avaliados quanto à capacidade de redução de células de tumor ascítico de Ehrlich, inoculadas na cavidade peritoneal de camundongos Swiss. Os extratos aquosos quente e de oxalato de amônio, testados na dose de 10 mg kg<sup>-1</sup>, apresentaram 86% e 85% de redução do número de células tumorais presentes no líquido ascítico obtido da cavidade peritoneal de camundongos, respectivamente. Nestes extratos foi observada a presença de  $\beta$ -D-glucanas (DALONSO *et al.*, 2010).

A partir dos corpos frutíferos de *P. eryngii* foi isolado um polissacarídeo solúvel em água (PEPw), com massa molar média de  $2,5 \times 10^4$  g mol<sup>-1</sup>, constituído por uma cadeia principal formada por unidades de galactose (1→6)-ligadas e manose (1→4)-ligadas, com ramificações em O-2 das unidades de galactose, por terminais não-redutores de arabinose. PEPw foi utilizado para tratamento de camundongos com tumor de Renca (tumor renal de camundongos), nas doses de 50, 100 e 200 mg kg<sup>-1</sup>. Os resultados mostraram elevação das atividades de células *natural killer* (NK) e linfócitos T citotóxicos (CTL) no baço e aumento da concentração sérica de TNF- $\alpha$  e IL-2. Além disso, foi observado que a inibição do desenvolvimento do tumor de Renca foi dose-dependente (YANG *et al.*, 2013).

O micélio e o caldo de cultivo de fungos do gênero *Pleurotus* produzidos por cultivo submerso também podem ser utilizados para produzir extratos com efeitos biológicos promissores (LINDEQUIST *et al.*, 2005).

Frações solúveis em água quente obtidas de biomassa micelial de *P. ostreatus* foram caracterizadas como  $\alpha$ -glucanas de baixa massa molar. Estas frações foram utilizadas para avaliar o desenvolvimento de células HT-29 (células de tumor do cólon humano) e promoveram aumento da apoptose e inibição da proliferação celular (LAVI *et al.*, 2006).

A partir do caldo de cultivo obtido por cultivo submerso de *P. djamor*, extratos foram preparados por precipitação do caldo de cultivo com etanol e acetona. Foi avaliado o tempo de sobrevida de camundongos com implante subcutâneo de tumor Sarcoma 180 tratados com os extratos nas doses de 30 e 100 mg kg<sup>-1</sup>, por 5 dias

consecutivos. O teste de sobrevivência demonstrou 100% de sobrevivência para os grupos tratados com o extrato etanólico nas duas doses após 30 dias (DE BARBA *et al.*, 2011).

O precipitado etanólico oriundo do caldo de cultivo (PE1) e do micélio deslipidificado (PM2) obtidos de cultivo submerso de *P. sajor-caju* foram utilizados para avaliar o desenvolvimento do tumor Sarcoma 180 (em massa) inoculado subcutaneamente em camundongos Swiss. Os camundongos foram tratados por 10 dias consecutivos, uma vez ao dia e para a dose de 3 mg kg<sup>-1</sup> os extratos demonstraram uma inibição de 86% para o extrato PE1 e em 80% para o extrato PM2 (ASSIS *et al.*, 2013).

Várias frações polissacarídicas extraídas de biomassa micelial de *P. ostreatus* foram utilizadas para avaliar a atividade antitumoral utilizando camundongos Swiss inoculados com os tumores de Ehrlich e Sarcoma 180, na dose de 30 mg kg<sup>-1</sup> por 10 dias, uma vez ao dia. As frações FC, FI e FII inibiram o desenvolvimento do tumor de Ehrlich em 60,6, 76,5 e 73,6%, respectivamente, enquanto FII e FIII-2 resultaram em 85,6 e 93,6%, respectivamente, de inibição sobre o Sarcoma 180 (FACCHINI *et al.*, 2014).

A atividade antitumoral destas  $\beta$ -glucanas esta relacionada a capacidade de modular uma grande variedade de respostas imune inata, induzindo a produção de citocinas, espécies reativas de oxigênio, produção e fagocitoses por neutrófilos e macrófagos (BARRETO-BERGTER e FIGUEIREDO, 2014). A diferença nas atividades antitumorais das  $\beta$ -glucanas pode ser atribuída a diferenças nas características estruturais, tais como o tamanho molar e a conformação adotada em solução (ZHANG *et al.*, 2004a; CUI *et al.*, 2007; RUTHES *et al.*, 2015).

Os fungos do gênero *Pleurotus*, além de apresentarem atividades antitumorais, também apresentam efeitos prebiótico, gastroprotetor, imunomodulador, hipoglicêmico, antibacteriano e anti-inflamatório, que estão relatados nos trabalhos apresentados a seguir.

A atividade prebiótica *in vitro* foi avaliada através de quatro linhagens de *Lactobacillus*, três linhagens de *Bifidobacterium* e duas linhagens de *Enterococcus*,

crecidas em meio de cultivo MRS adicionado de fração purificada de  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-ligada e de  $\alpha$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3)-ligada, separadamente, oriundas de corpos frutíferos de *P. ostreatus* e de *P. eryngii*. Para *Lactobacillus* foi observado um aumento na taxa de crescimento e na concentração celular para as duas frações extraídas dos dois fungos. Para *Enterococcus*, a taxa de crescimento foi estimulada pela  $\alpha$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3)-ligada e a concentração celular pela  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-ligada. Para *Bifidobacterium*, cada linhagem testada apresentou um comportamento diferente, sendo que, as frações oriundas de *P. ostreatus* estimularam o crescimento da linhagem A e inibiram o desenvolvimento da linhagem B. As frações oriundas de *P. eryngii* inibiram o crescimento da linhagem A e promoveram um aumento da concentração celular para a linhagem B. A linhagem C teve seu crescimento inibido quando foram utilizadas as duas frações em altas concentrações (SYNYTSYA *et al.*, 2009).

Um polissacarídeo solúvel em água (POPw) foi obtido de corpos frutíferos de *P. ostreatus*, com massa molar de  $2,3 \times 10^4$  Da, composto por unidades de glucose, galactose e manose, majoritariamente. A administração de  $400 \text{ mg kg}^{-1}$  de POPw, via oral, por 14 dias apresentou redução de 58% da área de úlcera gástrica em ratos, demonstrando o efeito gastroprotetor do polissacarídeo (YANG *et al.*, 2012).

Foi utilizada uma  $\beta$ -glucana (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-ligada, isolada de *P. ostreatus*, para tratamento de colite induzida por ácido acético em camundongos. Para tratamento intraperitoneal, 2% de  $\beta$ -glucana foram solubilizadas em solução salina e as doses de 30 e  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  promoveram redução de 75% e 90% dos danos no cólon, respectivamente. O tratamento oral por 4 semanas, com ração contendo 10% de  $\beta$ -glucana, promoveu uma redução de 39% dos danos promovidos pela colite na mucosa de camundongos tratados quando comparados a camundongos não tratados. A atividade da mieloperoxidase (MPO) foi avaliada nos tecidos do cólon de animais com danos provocados pela colite e foi observado que o tratamento não preveniu o aumento da atividade da mieloperoxidase no tecido com inflamação, resultado da resposta inflamatória neste tecido, mas nos tecidos sem a evidencia macroscópica de inflamação, os níveis de mieloperoxidase foram baixos. Os dados sugerem um efeito imunomodulador da  $\beta$ -glucana (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-ligada (NOSÁLOVÁ *et al.*, 2001).

O extrato aquoso quente obtido do corpo frutífero de *P. sajor-caju* contendo 5,4% de  $\alpha$ -glucana e 80,6% de  $\beta$ -glucana (chamado de GE) promoveu aumento da proliferação de pré-adipócitos (células 3T3-L1) que, quando diferenciados a adipócitos, apresentaram aumento da lipogênese quando tratados com GE, comparado a adipócitos tratados com insulina, com maior efeito nas doses de 0,01 a 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (KANAGASABAPATHY *et al.*, 2014).

O caldo de cultivo produzido por cultivo submerso de *P. ferulae* apresentou efeito hipoglicemiante. O exopolissacarídeo extraído do caldo de cultivo foi desproteínizado e separado por membrana de ultrafiltração, obtendo-se um polissacarídeo (PSF) com massa molar de  $6,3 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$ , que foi utilizado para investigar a atividade hipoglicemiante em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina. A glicemia em jejum diminuiu em 27% para dose de 250  $\text{mg kg}^{-1}$  de PSF em 21 dias. Em 42 dias, os níveis de triglicerídeos diminuíram em 70%, de lipoproteína de baixa densidade (LDL) em 26,9% e o nível de insulina aumentou quando comparado a ratos com dieta livre de PSF (WANG *et al.*, 2014).

Todos estes efeitos, *in vitro* e *in vivo*, têm motivado pesquisadores a utilizar os polissacarídeos em testes clínicos para confirmar os efeitos observados. Jeseňák *et al.* (2010) investigaram o efeito do Imunoglukan P4H® (uma  $\beta$ -glucana insolúvel isolada de corpos frutíferos de *P. ostreatus* combinada com vitamina C) em um grupo de crianças sofrendo de infecções recorrentes do trato respiratório (RRTIs) e observaram um declínio da morbidade respiratória em crianças, não sendo relatado efeitos colaterais durante o estudo.

Outro estudo foi realizado com Imunoglukan P4H® e sua atividade sobre RRTIs. Participaram do estudo 175 crianças que apresentaram 5 infecções no trato respiratório em até 12 meses antes do início da pesquisa. Estas crianças foram divididas em dois grupos, um tratado com Imunoglukan P4H® e outro com placebo (vitamina C). As substâncias foram administradas via oral todas as manhãs, com estômago cheio, por 6 meses. No grupo teste, 36% das crianças não sofreram quaisquer infecções respiratórias em todo o tratamento, em comparação com 21% no grupo do placebo. Também foi observada a diminuição da frequência de gripe e do número de infecções do trato respiratório inferior (JESEŇÁK *et al.*, 2013).

A nocicepção pode ser definida como a detecção de estímulos nocivos e a subsequente transmissão de informação codificada ao cérebro. Em contraste, a dor é essencialmente um processo perceptual que surge em resposta a tal atividade (KIDD e URBAN, 2001).

A dor crônica é considerada uma doença, que envolve dois mecanismos, a estimulação física ou química dos nociceptores devido a lesão dos tecidos, chamada de dor nociceptiva, e a dor promovida por lesão do sistema nervoso, chamada de dor neuropática (VALE, 2003). O reconhecimento da necessidade de novas estratégias para o tratamento da dor tem levado ao desenvolvimento de medicamentos inovadores (KIDD e URBAN, 2001). Entre estas opções estão os polissacarídeos de fungos que, segundo trabalhos de vários pesquisadores, apresentam efeitos analgésicos promissores.

Smiderle *et al.* (2008a) isolaram uma  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-ligada do extrato aquoso quente de corpos frutíferos de *P. pulmonarius* que, na dose de 3 mg kg<sup>-1</sup>, demonstrou capacidade de inibir em 85% a resposta nociceptiva induzida por ácido acético, enquanto, a indometacina (10 mg kg<sup>-1</sup>) e a dexametasona (2 mg kg<sup>-1</sup>) (medicamentos analgésicos) inibiram 92% e 30%, respectivamente. Esta mesma glucana, na dose de 30 mg kg<sup>-1</sup>, promoveu a redução do tempo de nocicepção, avaliado através do teste de formalina, atingindo 43% e 96% de redução na primeira e segunda fases do teste, respectivamente (SMIDERLE *et al.*, 2008a). No teste de nocicepção induzida por glutamato, foi observada inibição de 96% na dose de 10 mg kg<sup>-1</sup> (BAGGIO *et al.*, 2010), demonstrando a capacidade da  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-ligada em promover o efeito antinociceptivo.

Buscando confirmar a atividade antinociceptiva da glucana isolada por Smiderle *et al.* (2008a), Baggio *et al.* (2012) utilizaram outros agentes indutores de nocicepção, a capsaicina, o cinamaldeído, o mentol, salina acidificada e PMA. O PMA (forbol 12-miristato 13-acetato) é um ativador da proteína quinase C (PCK), responsável pela ativação das vias de sinalização de nocicepção (FERREIRA *et al.*, 2005). Quando a glucana foi usada na dose de 10 mg kg<sup>-1</sup> foi observada uma redução de 97% na resposta inflamatória induzida por mentol. Na dose de 30 mg kg<sup>-1</sup> houve uma inibição de 92% e 67% da resposta nociceptiva induzida por capsaicina e cinamaldeído, respectivamente. Quando o indutor de nocicepção foi salina acidificada, uma redução

de 89% na resposta nociceptiva foi observada para a glucana (dose de 100 mg kg<sup>-1</sup>). Quando PMA foi usado na indução de nocicepção, a glucana (doses de 10, 30 e 100 mg kg<sup>-1</sup>) apresentou uma inibição dose-dependente, apresentando inibição de 100% para a dose de 100 mg kg<sup>-1</sup>, demonstrando a capacidade desta  $\beta$ -D-glucana como princípio ativo para medicamentos analgésicos (BAGGIO *et al.*, 2012).

Além das glucanas, manogalactanas metiladas também demonstram efeito sobre nocicepção. Os corpos frutíferos de *P. pulmonarius* foram colocados em água fria e do extrato foi isolado uma manogalactana metilada, com cadeia principal formada por unidades de  $\alpha$ -D-Galp (1 $\rightarrow$ 6)-ligadas, sendo algumas destas unidades de  $\alpha$ -D-Galp substituídas em O-3 por grupo metil e em O-2 por unidades de  $\beta$ -D-Manp, com massa molar de 2,39x10<sup>4</sup> g mol<sup>-1</sup>. Esta manogalactana apresentou uma taxa de inibição de 93% das contrações induzidas por ácido acético na dose de 30 mg kg<sup>-1</sup> (SMIDERLE *et al.*, 2008b).

Outros relatos têm demonstrado que glucanas obtidas de *Pleurotus* apresentam atividade sobre a resposta inflamatória.

A inflamação é uma resposta do sistema imune contra estímulos como infecções ou lesões de tecidos. O processo inflamatório é complexo, envolvendo elementos celulares e mediadores químicos. Entre os mediadores químicos tem-se os provenientes do plasma, como a bradicinina e os elementos do complemento, e entre os oriundos das células encontram-se a histamina, a serotonina, a substância-P e as enzimas lisossômicas dos neutrófilos, todos armazenados na célula (VALE, 2003).

As células também podem liberar mediadores químicos quando estimuladas, entre estes estão as citocinas pró-inflamatórias como as interleucinas e o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), as quais induzem no endotélio vascular a expressão de moléculas de adesão que estimulam a aderência dos leucócitos ao endotélio, seguida da sua migração para os tecidos onde vão libertar mais mediadores (CRONSTEIN *et al.*, 1995).

Macrófagos, juntamente com neutrófilos, são a primeira linha de defesa do organismo após a barreira epitelial, participando da resposta do sistema imune inato. Vários relatos demonstram que polissacarídeos exibem uma variedade de efeitos

farmacológicos benéficos em função da sua habilidade em modular a função imune mediada por macrófagos (SCHEPETKIN e QUINN, 2006).

O extrato aquoso quente obtido de corpos frutíferos de *P. florida* foi testado em macrófagos (RAW 264,7) estimulados por LPS. O extrato na dose de 2 mg mL<sup>-1</sup> demonstrou inibição na expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e na produção de óxido nítrico (NO) (IM *et al.*, 2014), um radical livre produzido por macrófagos ativados, que fazem mediação de diversos processos fisiológicos e patológicos incluindo a inflamação (KIDD e URBAN, 2001). O extrato nas doses de 5, 15 e 50 mg kg<sup>-1</sup> também inibiu o desenvolvimento de edema de pata induzido por carragenina em 45,8%, 53,0 % e 55,9%, respectivamente, demonstrando atividade anti-inflamatória (IM *et al.*, 2014).

O efeito contrário, ou seja, atividade pró-inflamatória foi relatada por alguns pesquisadores. Uma  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 6)-ligada (PS-I) linear foi isolada do extrato aquoso quente de corpos frutíferos de *P. florida* e demonstrou capacidade de aumentar a produção de óxido nítrico (NO) em 127% na dose de 200  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> em macrófagos peritoneais (DEY *et al.*, 2012).

Do extrato aquoso quente de corpos frutíferos de *P. sajor-caju* foi obtida uma  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-ligada, com massa molar de  $9,75 \times 10^5$  Da, que foi adicionada em doses entre 0,1 a 300  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> à uma cultura de células de macrófagos (RAW 264,7) estimulados com LPS. Os autores observaram que a glucana não afetou a viabilidade celular, promoveu aumento de produção de óxido nítrico (NO) e das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , apresentando um efeito imunoestimulante (CARBONERO *et al.*, 2012).

A ativação de macrófagos peritoneais e a sua capacidade de fagocitose foram avaliadas em relação a extratos aquoso e alcalino de corpos frutíferos de *P. tuber-regium*. Os extratos promoveram a proliferação celular de forma tempo-dependente e melhoraram a fagocitose de forma dose-dependente, em comparação com tratamento com LPS. Ainda, foi observado o aumento na produção de óxido nítrico (NO), na expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e na liberação de citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , de forma dose-dependente, demonstrando a capacidade pró-inflamatória dos polissacarídeos (WU *et al.*, 2014).



Segundo El-Enshasy e Hatti-Kaul (2013) polissacarídeos de fungos (chamados de PAMP) ativam os componentes do sistema imune inato, macrófagos, neutrófilos, células *natural killer* (NK) e células dendríticas, e estimulam a expressão e secreção de citocinas, tais como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e IL-12. Como apresentam alta massa molar, não são capazes de penetrar as membranas celulares, sendo que o mecanismo de resposta celular envolve o reconhecimento e ligação dos polissacarídeos em receptores (PRR) presentes nestas membranas (SCHEPETKIN e QUINN, 2006; GOODRIDGE *et al.*, 2009; DEY *et al.*, 2012). Podem ser considerados como indutores multi-citocinas hábeis em induzir a expressão de genes de várias citocinas imunomodulatórias e de receptores de citocinas (WASSER, 2015).

Os  $\beta$ -glucanos são reconhecidos por receptores membranares (PRR) do tipo Dectina-1, o receptor complemento 3 (CR3) e os receptores *Toll-like* (TLR), em especial o TLR2 e TLR4, sendo que a eficácia da atividade imunomoduladora dos polissacarídeos depende da afinidade de ligação destes aos receptores celulares (SCHEPETKIN e QUINN, 2006; ADAMS *et al.*, 2008; GOODRIDGE *et al.*, 2009; EL-ENSHASY e HATTI-KAUL, 2013).

Os receptores TLRs apresentam um domínio extracelular amino-terminal contendo repetições ricas em leucina e domínios intracelulares que são parcialmente homólogos como os receptores de domínio TLR1/IL-1, que conduz às vias de sinalização que culminam na ativação de complexos transcrpcionais de NF- $\kappa$ B (fator de transcrição nuclear) (BARRETO-BERGTER e FIGUEIREDO, 2014).

O TLR2 tem sido apontado como o receptor envolvido no reconhecimento dos polissacarídeos fúngicos, principalmente das  $\alpha$ -glucanas, enquanto o TLR4 tem demonstrado reconhecer as mananas, além do reconhecimento de LPS (BARRETO-BERGTER e FIGUEIREDO, 2014).

Os receptores TLR reconhecem moléculas de  $\beta$ -glucanas induzindo o NF- $\kappa$ B para produzir citocinas inflamatórias como a IL-12 e TNF- $\alpha$ . Em cooperação com TLRs, Dectina-1 estimula fagocitoses em macrófagos, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (GANTNER *et al.*, 2003).

A Dectina-1, uma proteína transmembrana do tipo II, demonstra uma extraordinária especificidade por  $\beta$ -glucanas (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-ligadas, mas não

reconhece mananas,  $\beta$ -glucanas (1 $\rightarrow$ 6) ou (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 4)-ligadas (ADAMS *et al.*, 2008).

### 3 JUSTIFICATIVA

Basidiomicetos são normalmente cultivados de forma sólida (cultivo sólido), obtendo-se corpos frutíferos (basidiomas). Estes corpos frutíferos podem ser utilizados para alimentação como componente gastronômico interessante, por apresentarem cores, sabores e aromas diferenciados. Podem também ser utilizados como suplemento alimentar, na forma de pó em cápsulas, devido as características nutricionais que possuem.

Vários estudos são realizados com os extratos brutos destes corpos frutíferos, buscando evidenciar a capacidade farmacológica destes, com o intuito de utilizá-los como medicamento (SUSEEM *et al.*, 2011; IM *et al.*, 2014; KANAGASABAPATHY *et al.*, 2014). Estes extratos regulam a resposta imunológica aumentando a resistência à doenças (WASSER, 2015). Porém, extratos de cogumelos podem apresentar outros agentes biológicos ativos, como proteínas, terpenos, compostos fenólicos, esteróides e nucleosídeos (SMIDERLE *et al.*, 2014). Então, para elucidar o componente responsável pelo efeito terapêutico é importante que o componente seja isolado e caracterizado.

Após a elucidação do agente biológico, é necessário produzi-lo em escala industrial. Nesta escala devem ser incluídos sistemas de controle de condução do processo, entre eles, as boas práticas de fabricação para ingredientes farmacológicos ativos. Para o cultivo sólido alguns problemas podem surgir, principalmente em relação ao espaço necessário para produção em escala industrial, aos cuidados em relação a contaminação e a possibilidade de poucas formas de controle dos parâmetros de produção (EL-ENSHASY e HATTI-KAUL, 2013).

Porém, estes fungos podem ser cultivados na forma submersa (cultivo líquido), com vantagens para esta forma de cultivo em relação ao cultivo sólido, principalmente em relação ao tempo de cultivo, à condução de produção de forma estéril, aos controles dos parâmetros de processos e a reprodutibilidade dos parâmetros de

produção (EL-ENSHASY e HATTI-KAUL, 2013). Na forma de cultivo líquido obtém-se a biomassa micelial e o caldo de cultivo.

Entretanto, estudos de caracterização das estruturas polissacarídicas originadas do caldo de cultivo e de biomassa micelial são poucos, como também, a descrição de suas atividades biológicas. Segundo Wasser (2015), o micélio vegetativo (biomassa micelial) produzido em cultivo puro tem recebido pouco atenção na literatura.

Portanto, este trabalho procurou avaliar se a forma de cultivo do fungo (sólido ou submerso) promove modificações nas estruturas polissacarídicas presentes, assim como, observar se os polissacarídeos obtidos apresentam ação farmacológica.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Produzir, extrair, purificar e caracterizar estruturalmente polissacarídeos intracelulares e extracelulares oriundos do cultivo submerso e da parede celular de corpos frutíferos de *Pleurotus sajor-caju*, assim como, avaliar as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória dos polissacarídeos caracterizados estruturalmente.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Analisar a cinética do processo fermentativo para o cultivo submerso em meio POL modificado sem extrato de levedura;
- b) Extrair, fracionar e purificar dos polissacarídeos presentes nos corpos frutíferos, na biomassa micelial e no caldo de cultivo de *Pleurotus sajor-caju*;
- c) Comparar a estrutura química dos polissacarídeos oriundos dos corpos frutíferos, da biomassa micelial e do caldo de cultivo de *Pleurotus sajor-caju*;
- d) Avaliar o potencial terapêutico dos polissacarídicos purificados e caracterizados em relação à ação antinociceptiva e anti-inflamatória;

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 METAS

#### CULTIVO

- Produção de corpos frutíferos através de cultivo sólido em palha de folha de bananeira
- Obtenção de caldo de cultivo e biomassa micelial por cultivo submerso

#### EXTRAÇÃO

- Precipitação de polissacarídeos provenientes do caldo de cultivo
- Extração aquosa e alcalina da biomassa micelial
- Extração aquosa e alcalina de corpos frutíferos

#### PURIFICAÇÃO

- Purificação dos polissacarídeos obtidos por processos de congelamento e descongelamento, dialise e ultrafiltração.

#### CARACTERIZAÇÃO

- Análises das frações purificadas quanto à composição monossacarídica, homogeneidade, ressonância magnética nuclear, metilação, degradação controlada de Smith, entre outros.

#### ATIVIDADE BIOLÓGICA

- Atividade antinociceptiva através do modelo de contorções abdominais e formalina.
- Ação anti-inflamatória através do modelo de carragenina e peritonite.

## 5.2 MICRO-ORGANISMO E MANUTENÇÃO

*Pleurotus sajor-caju* obtido do Centro de Cultivo de Basidiomicetos da Universidade de São Paulo sob o código CCB 019 foi utilizado nos experimentos. Esta linhagem foi escolhida em função de resultados anteriores do grupo de pesquisa (BONATTI *et al.*, 2004; ASSIS *et al.*, 2013). A linhagem foi mantida em meio TDA (Trigo Dextrose Ágar) (FURLAN *et al.*, 1997), em placa de Petri, sob refrigeração (4 °C) e os repiques foram feitos a cada três meses. A Figura 8 apresenta uma placa de Petri com o micélio de *Pleurotus sajor-caju* em sua superfície.



FIGURA 8 – MICÉLIO DE *Pleurotus sajor-caju* CRESCIDO EM PLACA DE PETRI COM MEIO TDA.

Fonte: o Autor.

## 5.3 PRODUÇÃO DE CORPOS FRUTÍFEROS

A produção de corpos frutíferos foi realizada nas dependências da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE (Joinville-SC). Os corpos frutíferos de *P. sajor-caju* CCB 019 foram produzidos em folhas de bananeira, conforme metodologia proposta por Silveira *et al.* (2008). O fluxograma de produção dos corpos frutíferos está apresentado na Figura 9.

### 5.3.1 Produção de inóculo

Utilizaram-se grãos de trigo como suporte e substrato para o crescimento. Os grãos foram colocados em água, na proporção de 2:1 (v/m), e fervidos durante 10 minutos. Esta infusão foi peneirada e filtrada para separar o extrato aquoso do resíduo dos grãos. O resíduo de grãos foi suplementado com sulfato de cálcio (1,3% massa

seca) e carbonato de cálcio (0,35% massa seca) e colocados em pacotes plásticos de polipropileno (18 x 30 cm), na proporção de 150g de grãos por pacote. Os pacotes plásticos foram fechados com espuma e esterilizados em autoclave a 121 °C durante 1 hora.

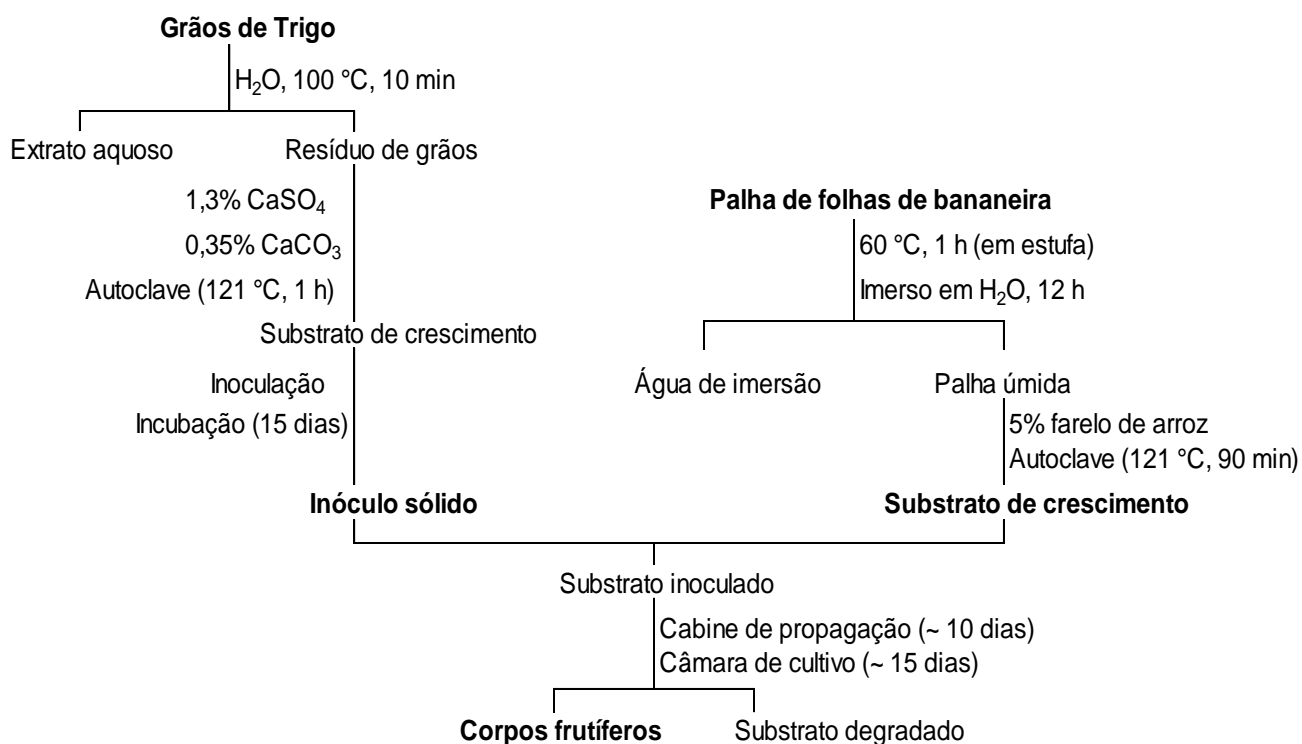


FIGURA 9 – FLUXOGRAMA DE PRODUÇÃO DOS CORPOS FRUTÍFEROS DE *P. sajor-caju*.

Após a esterilização, os pacotes plásticos foram resfriados a temperatura ambiente e inoculados, em cabine de segurança biológica do tipo fluxo laminar, com 3 discos de ágar de 15 mm de diâmetro, contendo micélio de *P. sajor-caju*, retirados de placas de Petri. Os pacotes com os grãos inoculados (FIGURA 10) foram incubados em estufa a 30 °C, em ausência de luz, por 15 dias ou até a completa colonização da superfície dos grãos pelo micélio. Os pacotes foram mantidos sob refrigeração por, no máximo, três meses. Durante este período os grãos foram utilizados como inóculo sólido para os pacotes contendo composto preparado à base de palha de bananeira.



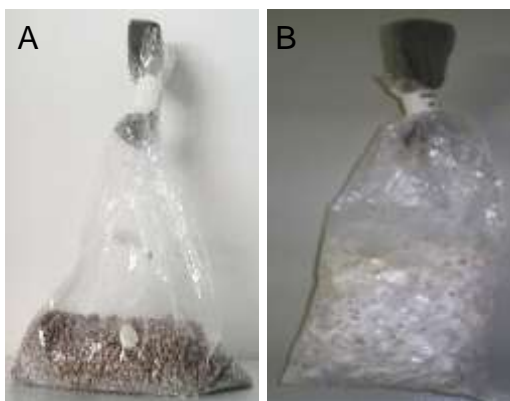


FIGURA 10 – GRÃOS DE TRIGO COM DISCO DE TDA CONTENDO MICÉLIO (A) E GRÃOS DE TRIGO COM COLONIZAÇÃO COMPLETA PELO MICÉLIO (B) DE *P. sajor-caju*.

Fonte: o Autor.

### 5.3.2 Preparação e inoculação do substrato

As folhas secas (palha) de bananeira foram picadas em partículas de 2 a 5 cm, acondicionadas em sacos de ráfia e imersas em água por 12 horas. Após este período, o excesso de água foi escorrido por, aproximadamente, 2 horas. Este substrato foi colocado em pacotes plásticos de polipropileno (25 x 35 cm), fechados com espuma e fita crepe. Os pacotes plásticos foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 1 hora, resfriados e inoculados em cabine de segurança biológica do tipo fluxo laminar usando 10% de inóculo em relação à massa de substrato seco. Os pacotes foram colocados em cabine de propagação, em ausência de luz a 25 °C, até completa colonização do substrato pelo micélio fúngico (FIGURA 11). Após, os pacotes foram transferidos para a câmara de cultivo.



FIGURA 11 – PACOTES COM PALHA DE BANANEIRA COLONIZADAS POR *P. sajor-caju*.

Fonte: o Autor.

### 5.3.3 Desenvolvimento de corpos frutíferos

A indução dos primórdios se deu por meio de pequenas perfurações nos pacotes plásticos. A câmara de cultivo (FIGURA 12) dispõe de controle automático de temperatura ( $28 \pm 2$  °C), iluminação (fotoperíodo de 12 horas) e umidade relativa do ar (90%).



FIGURA 12 – CÂMARA DE CULTIVO COM PACOTES DE SUBSTRATO INOCULADO.

Fonte: o Autor.

Quando foram observadas as emissões dos primórdios (FIGURA 13 A), os pacotes plásticos foram abertos nos locais de aparecimento, para iniciar a formação dos corpos frutíferos (FIGURA 13 B). Estes pacotes foram pulverizados, a cada 12 horas, com água para impedir a desidratação. Os corpos frutíferos foram colhidos quando as margens do píleo apresentavam-se planas (FIGURA 13 C) e liofilizados para a posterior extração dos polissacarídeos (item 4.5.1).



FIGURA 13 – PACOTES COM *P. sajor-caju* EM DIFERENTES FASES DE CRESCIMENTO: MICÉLIO DIFERENCIANDO EM PRIMÓRDIOS (A), PRIMÓRDIOS EM DESENVOLVIMENTO (B), CORPOS FRUTÍFEROS FORMADOS (C).

Fonte: o Autor.

## 5.4 PRODUÇÃO DE BIOMASSA MICELIAL E CALDO DE CULTIVO EM BIORREATOR

### 5.4.1 Preparo de inóculo

Para o cultivo submerso, o inóculo foi preparado em frasco Duran (2,0 L) com 400 mL de meio POL, com a seguinte composição (em g L<sup>-1</sup>): 5,0 de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,2 de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 1,0 de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2,0 de extrato de levedura; 1,0 de peptona e 20,0 de glucose (CAVAZZONI e ADAMI, 1992). O frasco foi inoculado com a totalidade do micélio, crescido por 7 dias em uma placa de Petri, com meio TDA. A transferência do micélio contido na placa para o frasco Duran, foi realizada com o auxílio de espátula e água destilada. Após a inoculação, o frasco Duran foi incubado em shaker a 30 °C e sob agitação recíproca de 120 rpm, por seis dias (FIGURA 14).



FIGURA 14 – INÓCULO LÍQUIDO DE *P. sajor-caju* EM FRASCO DURAN.

Fonte: o Autor.

### 5.4.2 Cultivo submerso em biorreator

Para a produção de biomassa micelial e de caldo de cultivo foi utilizado um biorreator de mistura completa (B. BRAUN, modelo BIOSTAT B), com dorna de vidro de capacidade útil de 5 L e volume de trabalho de 4 L (FIGURA 15). O meio de cultivo utilizado foi o meio POL modificado (ASSIS *et al.*, 2013): 2,5 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,2 g de

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 1,0 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,0 g de peptona; 1,0 g de CaCO<sub>3</sub>, 20,0 g de glucose em 1L de água destilada. O meio selecionado por Assis *et al.* (2013) continha extrato de levedura (1,0 g L<sup>-1</sup>) que neste trabalho foi retirado da sua composição, em função da presença de mananas (polissacarídeo formado por unidades de manose) oriundas do processo fermentativo com *Saccharomyces cerevisiae* (KOMURA *et al.*, 2010) presentes no extrato de levedura.

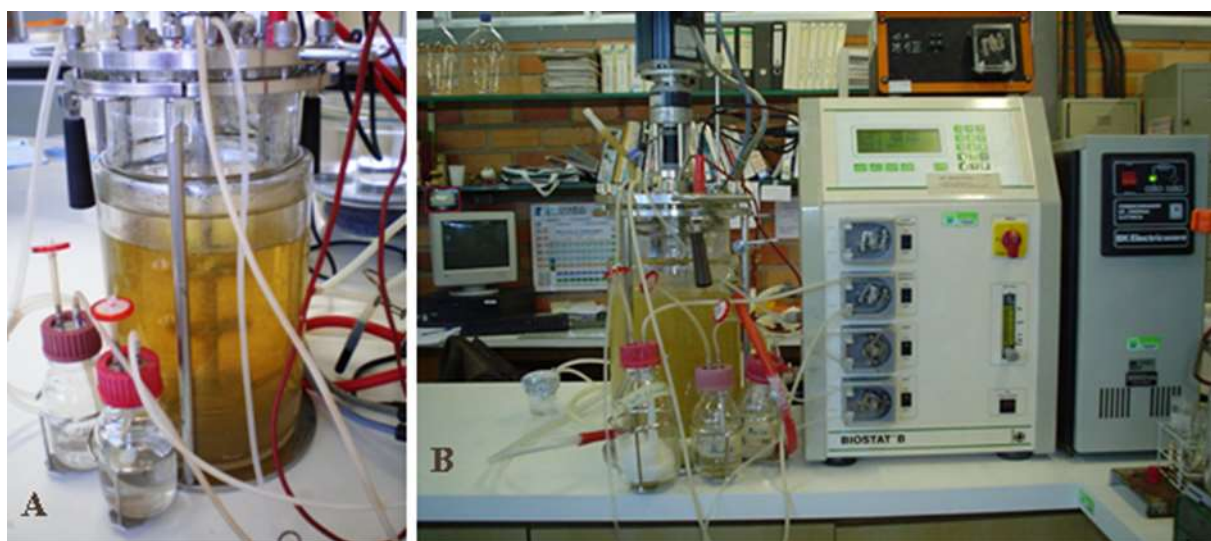


FIGURA 15 – CULTIVO DE *P. sajor-caju* EM BIORREATOR: TEMPO INICIAL (A), TEMPO FINAL (B).

Fonte: o Autor.

O processo foi conduzido em batelada e a fração de inóculo utilizada foi 10%, ou seja, 400 mL de inóculo para um volume final de 4 L (WISBECK, 2003). O pH foi controlado em 4,0 pela adição automática de soluções de NaOH 6 M e H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 12 N. A temperatura foi controlada em 30 °C. O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K<sub>La</sub>) inicial de 15 h<sup>-1</sup> foi mantido por uma vazão de ar de 0,25 L min<sup>-1</sup> e uma frequência de agitação fixada em 300 rpm.

Após verificar o consumo total da glucose (cerca de 490 horas), o processo de produção foi interrompido, o caldo de cultivo e a biomassa micelial retirados e separados por filtração em papel Whatman nº1. O caldo de cultivo foi reservado para a extração dos polissacarídeos extracelulares (EPS) (item 5.5.2) e a biomassa micelial foi congelada e liofilizada para posterior extração de frações polissacarídicas (item 5.5.1).



### 5.4.3 Avaliação da cinética do processo produtivo

Com o objetivo de avaliar a cinética de produção de biomassa micelial e exopolissacarídeos em meio POL modificado por Assis *et al.* (2013) sem extrato de levedura, durante o cultivo submerso, amostras foram retiradas para avaliar o consumo da fonte de carbono (glucose), o aumento da concentração de biomassa micelial e a produção de exopolissacarídeo (EPS).

A concentração de glucose no meio de cultivo foi determinada pelo método enzimático glucose-oxidase-peroxidase (CELM, Brazil). A concentração de biomassa micelial foi determinada pelo método de gravimetria, a 60 °C. A concentração de EPS foi determinada pelo método fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956), analisando o precipitado formado pela adição de acetona PA (8 °C, 3:1, v/v) ao caldo de cultivo.

Como parâmetros de avaliação da cinética do processo produtivo foram utilizados a concentração máxima em biomassa micelial e em EPS, a produtividade total de biomassa micelial e de EPS e o fator de conversão de glucose em biomassa micelial e de glucose em EPS.

Para o cálculo do fator de conversão de glucose em biomassa micelial ( $Y_{X/S}$ , g g<sup>-1</sup>) e de glucose em EPS ( $Y_{P/S}$ , g g<sup>-1</sup>) foram definidas pelas equações 1 e 2.

$$Y_{X/S} = (X - X_0) / (S_0 - S) \quad (1)$$

$$Y_{P/S} = (E - E_0) / (S_0 - S) \quad (2)$$

Onde:

$X_0$  é a concentração de biomassa micelial no início do processo (tempo inicial).

$X$  é a concentração de biomassa micelial no tempo de processo (tempo de processo foi definido como aquele em que a concentração de EPS atingiu seu valor máximo e tornou-se constante).

$E_0$  é a concentração de EPS no início do processo (tempo inicial).

$E$  é a concentração de EPS no tempo de processo.

$S$  é a concentração final de glucose no tempo de processo.

$S_0$  é a concentração de glucose no tempo inicial.

As produtividades totais em biomassa micelial (QX, mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) e em EPS (QP, mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) foram definidas pelas equações 3 e 4.

$$QX = (X - X_0) / t \quad (3)$$

$$QP = (E - E_0) / t \quad (4)$$

Onde:

t é o tempo de processo (h).

## 5.5 EXTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS

Os polissacarídeos dos corpos frutíferos e da biomassa micelial foram obtidos separadamente, após deslipidificação, seguida por subseqüentes extrações aquosas a frio e a quente, seguida de extração alcalina com hidróxido de potássio a 2%. Os polissacarídeos do caldo de cultivo foram obtidos por precipitação com etanol 4 volumes. As Figuras 16 e 17 apresentam o fluxograma do processo de extração para os corpos frutíferos e de biomassa micelial de *P. sajor-caju*, respectivamente.

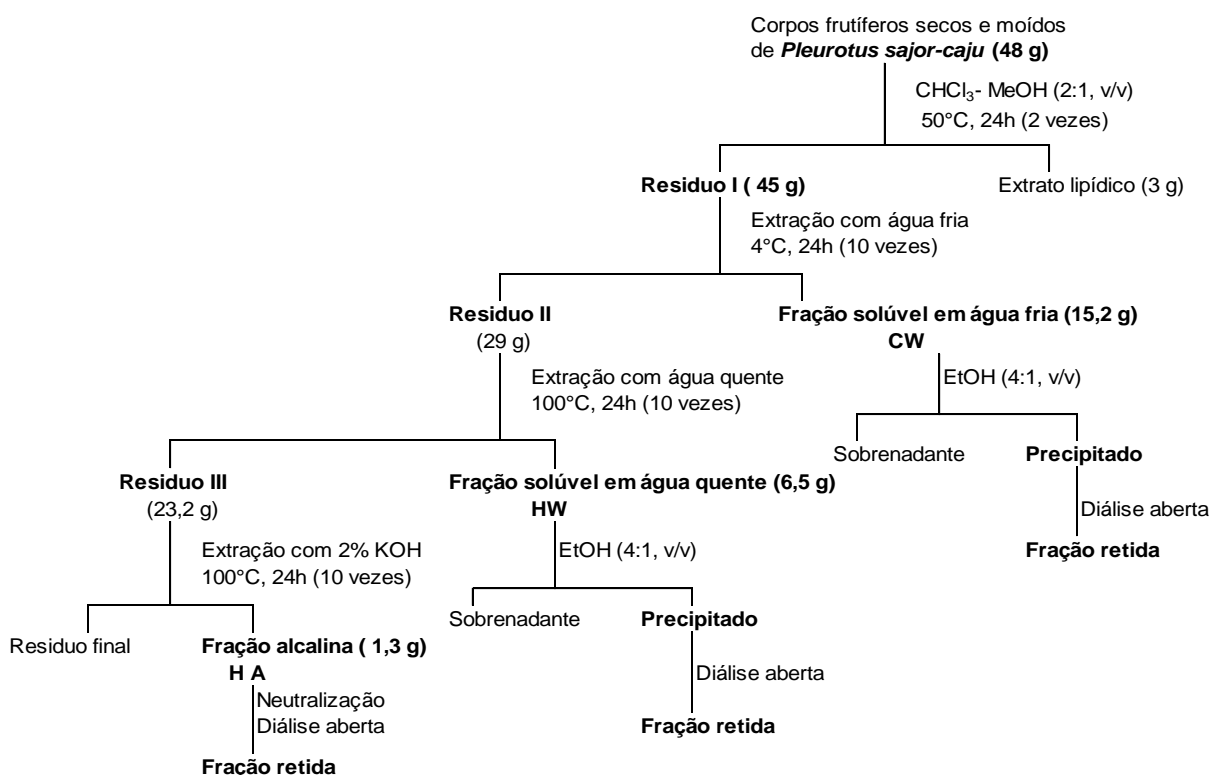


FIGURA 16 – FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS ORIUNDOS DE CORPOS FRUTÍFEROS DE *P. sajor-caju*.

### 5.5.1 Polissacarídeos dos corpos frutíferos e da biomassa micelial

#### 5.5.1.1 Deslipidificação

A deslipidificação promove a separação dos componentes apolares presentes como, lipídios, compostos fenólicos, terpenos, entre outros (RUTHES *et al.*, 2015). Os corpos frutíferos e a biomassa micelial foram liofilizados, triturados e deslipidificados com uma mistura de 1 L de clorofórmio:metanol (2:1; v/v), em extrator Soxhlet. O resíduo, denominado resíduo I foi liofilizado e submetido os processos de extração dos polissacarídeos.

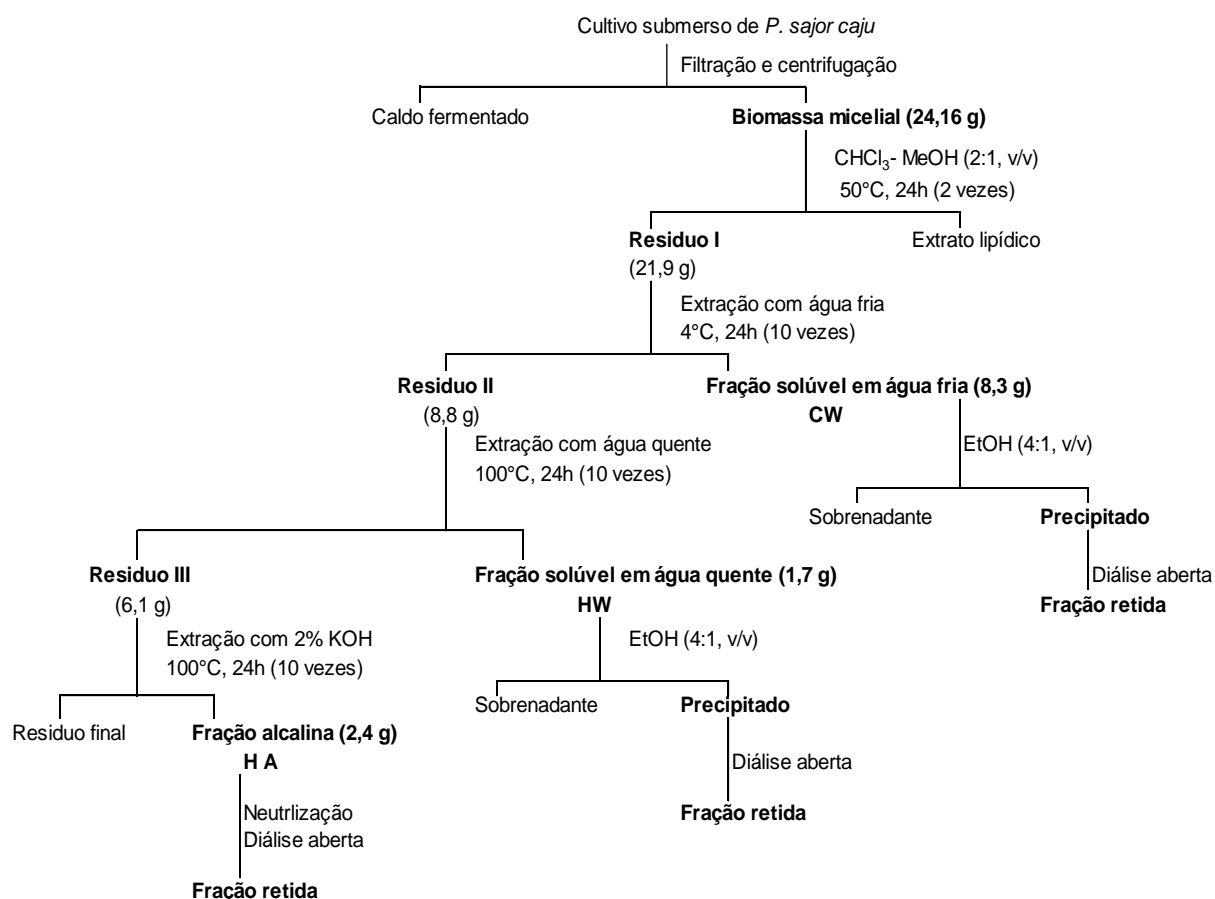


FIGURA 17 – FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS ORIUNDOS DA BIOMASSA MICELIAL DE *P. sajor-caju*.



### 5.5.1.2 Extração aquosa

Após a deslipidificação, o resíduo I tanto dos corpos frutíferos quanto da biomassa micelial, foram submetidos a processos de extração, que iniciaram com a extração aquosa a frio, seguida da extração aquosa a quente e, por último, a extração aquosa alcalina.

Ao resíduo I foi adicionada 800 mL de água destilada fria (1:10, m/v), mantido em agitação a 4 °C por 24 horas. Em seguida, o extrato aquoso frio (CW) foi separado do resíduo II por centrifugação em 6.000 rpm, 10 °C por 20 minutos. Este processo foi repetido por 10 vezes, ou seja, até a exaustão buscando aumentar o rendimento da fração obtida, assim como, diminuir a mistura de polissacarídeos presente na fração (RUTHES *et al.*, 2015). Os extratos aquosos a frio foram reunidos, concentrados em baixa pressão com evaporador rotativo e, em função do volume obtido do extrato, foi adicionado etanol PA na proporção de 1:4 (extrato:etanol, v/v). Esta mistura foi agitada e mantida a 4 °C por 24 horas, sendo o precipitado formado separado por centrifugação em 6.000 rpm, 5 °C por 20 minutos. O precipitado separado foi submetido a diálise aberta contra água em membrana com limite de exclusão de 2 kDa, sendo a fração retida liofilizada e utilizada para o fracionamento dos polissacarídeos do extrato aquoso frio (CW).

Ao resíduo II foi adicionada 800 mL de água destilada (1:10, m/v), aquecido até 100 °C e mantido em agitação, sob refluxo, a 100 °C por 24 horas. Em seguida, o extrato aquoso quente (HW) foi separado do resíduo III por centrifugação em 6.000 rpm, 10 °C por 20 minutos. Este processo foi repetido por 10 vezes. Os extratos aquosos quente foram reunidos e concentrados em baixa pressão com evaporador rotativo.

Para o extrato aquoso a quente de corpos frutíferos, ocorreu a separação da solução em três fases, um precipitado, uma fase solúvel de alta viscosidade (chamada de gel) e uma fase solúvel (chamada de HW). As três fases foram separadas por centrifugação em 3.000 rpm, 5 °C por 15 minutos, sendo o precipitado juntado ao resíduo III. A fase gel foi analisada quanto a composição monossacarídica e ressonância magnética nuclear. Na fase solúvel (HW), em função do volume obtido do extrato, foi adicionado etanol PA na proporção de 1:4 (extrato:etanol, v/v). Esta

mistura foi agitada e mantida a 4 °C por 24 horas, sendo o precipitado formado separado por centrifugação em 6.000 rpm, 5 °C por 20 minutos. O precipitado separado foi submetido a diálise aberta contra água em membrana com limite de exclusão de 2 kDa. A fração retida foi liofilizada e utilizada para o fracionamento dos polissacarídeos presentes no extrato aquoso quente (HW).

#### 5.5.1.3 Extração alcalina

Ao resíduo III foi adicionado borohidreto de sódio (~2 g) para proteger as unidades terminais não-redutoras, uma vez que soluções básicas atacam estas unidades promovendo a degradação da cadeia polissacarídica (RUTHES *et al.*, 2015) e mantido a temperatura ambiente por 12 horas. Após, foi adicionada uma solução de hidróxido de potássio a 2% (1:10, m/v), aquecido até 100 °C e mantido em agitação, sob refluxo, a 100 °C por 24 horas. Em seguida, o extrato alcalino (HA) foi separado do resíduo final por centrifugação em 6.000 rpm, 10 °C por 20 minutos. Este processo foi repetido por 10 vezes. Os extratos alcalinos foram reunidos, concentrados em baixa pressão com evaporador rotativo e neutralizados com ácido acético glacial. O extrato alcalino foi submetido a diálise aberta contra água corrente em membrana com limite de exclusão de 2 kDa. A fração retida foi liofilizada e utilizada para o fracionamento dos polissacarídeos presentes no extrato alcalino (HA).

#### 5.5.2 Polissacarídeos do caldo de cultivo (exopolissacarídeos)

O caldo de cultivo (3 L) foi concentrado em baixa pressão com evaporador rotativo e, em função do volume obtido, foi adicionado etanol PA na proporção de 1:4 (caldo:etanol, v/v). Esta mistura foi agitada vigorosamente e mantida a 4 °C por 24 horas, sendo o precipitado formado separado por centrifugação em 6.000 rpm, 10 °C por 20 minutos. O precipitado separado (PE1) foi submetido a diálise fechada em membrana com limite de exclusão de 2 kDa, promovendo a separação em uma fração retida e outra eluída, que foram liofilizadas. A fração retida foi utilizada para o fracionamento dos polissacarídeos presentes no caldo de cultivo.

A Figura 18 apresenta o fluxograma do processo de extração de polissacarídeos do caldo de cultivo de *P. sajor-caju*.

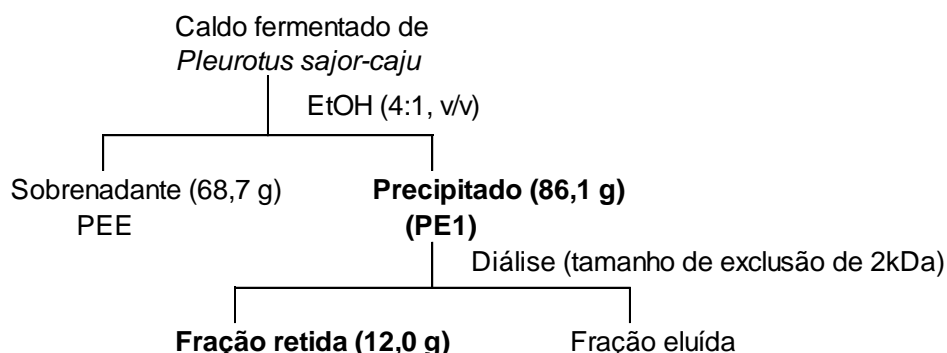


FIGURA 18 – FLUXOGRAMA DE PROCESSO DO EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS ORIUNDOS DO CALDO DE CULTIVO DE *P. sajor-caju*.

## 5.6 FRACIONAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

### 5.6.1 Congelamento e descongelamento

Este método foi proposto por Gorin e Iacomini (1984) e promove a separação de moléculas solúveis e insolúveis em água fria. Esta separação é possível em função da diferença dos graus de ramificação dos polissacarídeos, ou seja, moléculas com estruturas lineares ou com baixo grau de ramificação tendem a precipitar, enquanto estruturas altamente ramificadas estão presentes na fração solúvel (RUTHES *et al.*, 2015). De modo geral, a fração submetida a este processo, foi solubilizada em água destilada, sendo congelada e, posteriormente, descongeladas à temperatura ambiente. O precipitado formado (fração insolúvel em água fria) foi separado por centrifugação (6.000 rpm, 5 °C por 10 minutos) do sobrenadante (fração solúvel em água fria). Esse processo foi repetido diversas vezes até que, a partir do sobrenadante aquoso não houvesse formação de precipitado após congelamento e descongelamento.

As frações obtidas (solúvel e insolúvel em água fria) foram concentradas em baixa pressão com evaporador rotativo e liofilizadas.

### 5.6.2 Separação utilizando membranas com diferentes limites de exclusão

Este método se baseia na separação de estruturas por diferença de tamanho molar. De modo geral, a fração submetida a este processo foi solubilizada em água, em concentração de  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  (RUTHES *et al.*, 2015) e submetida à filtração em baixa pressão com membranas de diferentes limites de exclusão, escolhidas em função dos resultados observados nas análises de homogeneidade. A escolha do tamanho de poro adequado para a separação de uma mistura de polissacarídeos não se deve apenas à massa molar, mas também à conformação adquirida quando em solução (RUTHES *et al.*, 2015). O processo foi realizado com um sistema de filtração acoplado a uma bomba de vácuo.

## 5.7 ANÁLISE ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS ISOLADOS

### 5.7.1 Composição monossacarídica

Esta análise evidencia os monossacarídeos presentes na amostra analisada. Assim, um polissacarídeo deve ser fragmentado em unidades monossacarídicas, utilizando ácidos para a hidrólise. Em seguida, esta mistura de monossacarídeos passa por processos de redução, para a formação de alditóis, e de acetilação, formando acetatos de alditóis, que podem ser analisados por cromatografia gasosa.

Uma amostra da fração a ser analisada foi pesada (1 mg) e submetida à hidrólise ácida com 1 mL de solução de ácido trifluoracético (TFA) 1 M, a  $100^\circ\text{C}$ , por 12 horas (GORIN *et al.*, 1996). O excesso de ácido foi evaporado, foi adicionado 1 mL de água destilada e boroidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ) até atingir pH 9-10, deixando reagir por 24 horas à temperatura ambiente, para ocorrer a redução. Após, foi adicionado ácido acético PA até pH 3-4 e o conteúdo foi evaporado em rotaevaporador ( $50^\circ\text{C}$ ) até secar. Em seguida, foi adicionado 3 mL de metanol e o borato de trimetila foi removido por repetidas evaporações (3 vezes) em rotaevaporador ( $40^\circ\text{C}$ ) (WOLFROM e THOMPSON, 1963b). Após, foi adicionada uma mistura de anidrido acético:piridina (1:1 v/v; 0,3 mL), mantido à temperatura ambiente, por 12 horas para que os alditóis fossem acetilados (WOLFROM e THOMPSON, 1963a). Os acetatos de alditóis foram extraídos com clorofórmio PA e a fase clorofórmica foi lavada com

uma solução de sulfato de cobre 5% para a eliminação da piridina residual. A fase clorofórmica foi filtrada e evaporada à temperatura ambiente.

Os acetatos de alditóis foram analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-EM) e identificados pelos seus tempos de retenção e perfis de fragmentação obtidos por impacto de elétrons.

### 5.7.2 Metilação

Esta análise evidencia os derivados parcialmente metilados dos monossacarídeos que compõem a estrutura do polissacarídeo, possibilitando elucidar as ligações glicosídicas entre as unidades monossacarídicas. Para esta análise foi utilizado o método descrito por Ciucanu e Kerek (1984).

Uma amostra da fração a ser analisada foi pesada (5 mg), solubilizada em 0,5 mL de dimetilsulfóxido PA ( $\text{Me}_2\text{SO}$ ), adicionado de excesso de hidróxido de sódio seco e triturado, seguido pela adição de 0,5 mL de iodometano PA ( $\text{CH}_3\text{I}$ ) e mantido em agitação constante por 30 minutos e, em seguida, repouso por 24 horas. O procedimento foi realizado em tubo bem fechado para evitar a entrada de umidade. A reação de metilação foi interrompida com água destilada e neutralizada com ácido acético PA. O polissacarídeo metilado foi extraído com clorofórmio PA e a fase clorofórmica foi lavada diversas vezes com água destilada. A fase clorofórmica foi evaporada até secar. O processo de metilação foi repetido. O polissacarídeo metilado foi hidrolisado com solução de ácido fórmico a 45% a 100 °C, por 10 horas. O excesso de ácido fórmico foi evaporado em liofilizador e os derivados parcialmente metilados foram reduzidos com boroidreto de sódio deuterado ( $\text{NaBD}_4$ ) e acetilados com anidrido acético conforme método proposto por Wolfrom e Thompson (1963a,b), apresentados no item 5.7.1.

Os acetatos de alditóis parcialmente metilados foram analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-EM) e identificados pelos seus tempos de retenção e perfis de fragmentação obtidos por impacto de elétrons (SASSAKI *et al.*, 2005a,b).

### 5.7.3 Degradação controlada de Smith

Este método permite oxidar carbonos com grupos hidroxila vicinais, permitindo, após hidrólise branda, obter uma degradação parcial ou completa do polissacarídeo.

Uma amostra do polissacarídeo a ser analisado foi pesado (100 mg), solubilizado em 15 mL água destilada, oxidado com 15 mL de solução de periodato de sódio ( $\text{NaIO}_4$ ) a 0,1 M, à temperatura ambiente, na ausência de luz, em agitação por 72 horas. Em seguida, o material foi dialisado em membrana com limite de exclusão de 2 kDa por 24 horas contra água corrente. Foi reduzido com  $\text{NaBH}_4$  (quantidade suficiente para obter valor de pH entre 8 e 9) e mantido à temperatura ambiente por 12 horas. Após, foi neutralizado com ácido acético PA, dialisado em membrana com limite de exclusão de 2 kDa, contra água corrente. A seguir, foi parcialmente hidrolisado em solução de TFA pH 2,0, por 30 minutos a 100 °C (HAY *et al.*, 1965). Em seguida, foi dialisado em membranas com limite de exclusão de 2 kDa e liofilizado. O liofilizado foi analisado por ressonância magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$ .

### 5.7.4 Teste de homogeneidade e determinação da massa molar

O teste de homogeneidade demonstra a dispersão de moléculas em função de suas massas molares e conformação em solução aquosa.

Os ensaios de homogeneidade e determinação de massa molar foram realizados no aparelho da Wyatt Technology, equipado com um cromatógrafo de exclusão estérica de alto desempenho (HPSEC), com quatro colunas *ultrahydrogel* 2000, 500, 250 e 120 acopladas em série (com limites de exclusão de  $7 \cdot 10^6$ ,  $4 \cdot 10^5$ ,  $8 \cdot 10^4$  e  $5 \cdot 10^3$ , respectivamente), um detector de índice de refração (modelo Waters 2410) e um detector de espalhamento de *laser* multiângulo (MALLS) a 632,8 nm (modelo Dawn DSP), que promove a leitura do espalhamento de luz, captado em diferentes intensidades por detectores em diferentes ângulos. Segundo RUTHES *et al.* (2015) este ensaio produz informações precisas sobre a massa molar de polissacarídeos sem a necessidade de utilizar-se padrões.

Como eluente foi utilizada uma solução de nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) a 0,1 M contendo 0,2 g  $\text{L}^{-1}$  de azida de sódio ( $\text{NaN}_3$ ), com fluxo controlado de 0,6  $\text{mL min}^{-1}$ . A amostra foi solubilizada na solução usada como eluente, em concentração final de

1 mg mL<sup>-1</sup>, e filtrada através de membrana de acetato de celulose com diâmetro médio de poros de 0,22 µm. Uma quantidade de 100 µL foi injetada no equipamento e os resultados foram obtidos pelo *software* ASTRA 4.70.07.

A massa molar foi calculada após a determinação da taxa de variação do índice de refração com relação à concentração ( $dn/dc$ ), para as amostras que apresentaram um perfil homogêneo de eluição, uma vez que essa é uma característica específica de cada molécula. Para a determinação do  $dn/dc$ , a amostra foi solubilizada na solução usada como eluente, em concentração final de 1 mg mL<sup>-1</sup>, e filtrada através de membrana de acetato de celulose com diâmetro médio de poros de 0,45 µm. A partir desta amostra solubilizada e filtrada foram feitas diluições para as concentrações de 0,2, 0,4, 0,6 e 0,8 mg mL<sup>-1</sup>, as quais foram analisadas utilizando-se o detector de índice de refração, com as quatro colunas de *ultrahydrogel* desacopladas. O fluxo do solvente foi de 0,1 mL min<sup>-1</sup> e uma quantidade de 500 µL para cada uma das diluições e da solução-mãe foi injetada no equipamento, sendo os resultados obtidos com o *software* ASTRA 4.70.07.

## 5.8 MÉTODOS ANALÍTICOS

### 5.8.1 Cromatografia líquido-gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-EM)

A cromatografia líquido-gasosa acoplada à espectrometria de massa foi realizada em cromatógrafo a gás Varian Saturn 2000R – 3800 acoplado a um espectrômetro de massa Varian Ion-Trap 2000R, utilizando uma coluna capilar de sílica fundida DB-225 (30 m x 0,25 mm) e hélio ultrapuro, a um fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>, como gás de arraste. Os acetatos de alditóis foram analisados em rampa de temperatura de 50 até 220 °C (com taxa de aquecimento de 40 °C min<sup>-1</sup>). Os acetatos de alditóis parcialmente metilados foram analisados em rampa de temperatura de 50 até 215 °C (com taxa de aquecimento de 40 °C min<sup>-1</sup>).

### 5.8.2 Ressonância magnética nuclear (RMN)

Esta análise evidencia a anomericidade dos carbonos dos monossacarídeos presentes, as posições de ligações e ramificações da estrutura polimérica, assim como, confirma os dados obtidos na análise de metilação.

As análises de ressonância magnética nuclear (RMN) foram realizadas em espectrômetro Bruker Avance-DRX 400 MHz ou 600 MHz, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná. As amostras foram analisadas por sonda invertida de 5 mm de diâmetro, utilizando como solventes água deuterada ( $D_2O$ ) ou dimetilsulfóxido deuterado ( $Me_2SO-d_6$ ). Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em ppm e foram utilizados como padrões internos acetona PA ( $\delta$  30,2/2,22,  $^{13}C/^1H$ ) quando o solvente foi água deuterada ou  $Me_2SO-d_6$  PA ( $\delta$  39,4/2,40  $^{13}C/^1H$ ).

## 5.9 ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS POLISSACARÍDEOS CARACTERIZADOS ESTRUTURALMENTE

Os polissacarídeos purificados e caracterizados foram testados quanto às suas atividades biológicas, em termos de ação antinociceptiva e ação anti-inflamatória.

### 5.9.1 Soluções de tratamento

Os polissacarídeos que foram utilizados nos testes biológicos foram a manogalactana proveniente do caldo de cultivo,  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3)-ligada e a  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-ligada (provenientes do corpo frutífero).

Os polissacarídeos foram dissolvidos no veículo e testados em diferentes doses de tratamento. Para estes testes, foi utilizado como veículo uma solução de carboximetilcelulose (CMC) a 0,5%.

Também foram preparadas soluções de ácido acético a 0,9%, solução salina a 0,9%, solução de formalina 2,5%, solução de carragenina a 1% e solução de dexametasona a 1%, todas dissolvidas no veículo.



### 5.9.2 Animais

Os experimentos realizados para este trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIVILLE, conforme o ofício número 284/2011, emitido em 20 de setembro de 2011.

Foram utilizados camundongos albinos Swiss machos (*Mus musculus*), com peso de  $25 \pm 5$  g, obtidos do Biotério do Instituto Tecnológico do Paraná- TECPAR e do Biotério da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e do biotério da Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI). Os animais foram mantidos em condições padrão durante os experimentos, com água e ração a vontade, controle de temperatura em  $22 \pm 1$  °C, umidade em  $60 \pm 5\%$  e fotoperíodo de 12 horas.

### 5.9.3 Avaliação da atividade antinociceptiva

Para a avaliação da atividade antinociceptiva foram realizados os testes de contorções abdominais induzidas por ácido acético e o teste da formalina.

#### 5.9.3.1 Teste de contorções abdominais

Este teste foi proposto por Koster *et al.* (1959) e avalia a capacidade de uma substância teste em reduzir a quantidade de contorções abdominais induzidas por agentes irritantes em animais. O ácido acético causa uma resposta inflamatória local em função da liberação de substâncias endógenas como serotonina, histamina, prostaglandinas, bradicininas, que sensibilizam os nociceptores locais e causa a sensação de dor, que pode ser observada nos animais por suas respostas comportamentais (KOSTER *et al.*, 1959).

O teste foi conduzido com grupos (n=8) que receberam administração intraperitoneal (i.p.) do polissacarídeo testado solubilizado na solução veículo, em diferentes doses e um grupo que recebeu, via i.p., solução veículo (controle não tratado) na dose de  $10 \text{ mL kg}^{-1}$  de massa corporal.

Após trinta minutos, a resposta nociceptiva foi induzida, via i.p., com solução de ácido acético 0,9% na dose de  $10 \text{ mL kg}^{-1}$  nos grupos teste e controle não tratado (C).

Em outro grupo (n=8) foi administrado, via i.p., o polissacarídeo solubilizado na solução veículo na maior dose testada (3,0 mg kg<sup>-1</sup>) e, após 30 minutos, este grupo recebeu, via i.p., solução salina 0,9% na dose de 10 mL kg<sup>-1</sup>. Este grupo foi observado para verificar se o polissacarídeo testado poderia promover contorções abdominais.

Imediatamente, os animais foram colocados sob funis de vidro e observados durante vinte minutos para a contagem do número de contorções abdominais, considerando-se contorção abdominal o ato do camundongo estender uma ou duas patas traseiras, esfregando a região abdominal na bancada.

A atividade antinociceptiva foi avaliada pela relação entre o número de contorções apresentadas pelos grupos tratados com polissacarídeos em relação ao número de contorções apresentadas pelo grupo controle não tratado.

#### 5.9.3.2 Teste da formalina

O teste de formalina na pata foi proposto por Hunskaar e Hole (1987) e avalia a capacidade de uma substância teste em reduzir a nocicepção e relacionar esta ação à dor neurogênica ou à dor inflamatória. A principal característica deste teste é a presença de duas fases distintas de nocicepção: a dor neurogênica e a dor inflamatória. A primeira fase (dor neurogênica) começa imediatamente após a injeção de formalina, com duração de 5 minutos e está associada com a estimulação química direta das fibras aferentes. A segunda fase (dor inflamatória) ocorre entre 15 a 30 minutos após a injeção de formalina e está relacionada com a liberação de mediadores pró-inflamatórios, tais como a bradicinina, prostaglandinas e serotonina (HUNSKAAR e HOLE, 1987).

O teste foi conduzido com dois grupos (n=8) que receberam administração, via i.p., do polissacarídeo solubilizado na solução veículo, em diferentes doses e outros dois grupos (n=8) que receberam, via i.p., solução veículo na dose de 10 mL kg<sup>-1</sup> de massa corporal.

Após trinta minutos, um grupo tratado com polissacarídeo e um grupo com veículo (controle não tratado) receberam, por injeção intraplantar, na pata traseira, 20 µL de solução de formalina a 2,5%. Os outros dois grupos (um tratado com

polissacarídeo e outro com veículo) receberam por injeção intraplantar, na pata traseira, 20 µL de solução salina a 0,9%.

Imediatamente, os animais foram colocados sob funis de vidro, circundados por espelhos e as manifestações nociceptivas foram observadas ao longo de 30 minutos, que foram divididos em duas fases: a primeira fase, relacionada à dor neurogênica, avaliada nos primeiros 5 minutos e a segunda fase, relacionada à dor inflamatória, avaliada a partir de 20 até 30 minutos. Foram considerados comportamentos nociceptivos os atos de morder ou lambear a pata, mantê-la erguida, fazer movimentos rápidos e repetitivos da pata no ar ou na bancada (chacoalhadas). Os resultados foram expressos como tempo de manifestação do comportamento nociceptivo em segundos.

A atividade antinociceptiva foi avaliada pela relação entre o tempo de comportamentos nociceptivos apresentados pelos grupos tratados com os polissacarídeos em relação aos apresentados pelo grupo controle não tratado.

#### 5.9.4 Avaliação da atividade anti-inflamatória

Para a avaliação da atividade anti-inflamatória foi realizado o teste de edema de pata induzido por carragenina, proposto por Winter *et al.* (1962), que demonstra a capacidade de uma substância teste em reduzir o edema formado em uma pata.

O teste foi conduzido com um grupo (n=8) em que foi administrado, via i.p., o polissacarídeo solubilizado na solução veículo, em diferentes doses, um grupo que foi administrado, via i.p., solução veículo (controle não tratado, C) na dose de 10 mL kg<sup>-1</sup> de massa corporal, um grupo que recebeu, via i.p., um anti-inflamatório padrão (dexametasona a 1%), administrado na dose de 10 mL kg<sup>-1</sup> de massa corporal (Dexa). Após trinta minutos, os grupos tratados com os polissacarídeos, C e Dexa receberam injeção intraplantar na pata traseira, de 30 µL de solução de carragenina a 1% para promover a formação de edema.

Outro grupo (n=8) não foi tratado, mas recebeu injeção intraplantar na pata traseira, de 30 µL de solução veículo, para observar a formação de edema a partir do veículo (CN), sem influência da solução de carragenina.

Para o teste com o polissacarídeo manogalactana (PEIsR), um quinto grupo (n=8) recebeu injeção intraplantar na pata traseira, de 30  $\mu\text{L}$  de solução de carragenina a 1% e 30 minutos após, foi tratado com administração, via i.p., de PEIsR solubilizado na solução veículo, na dose de 0,1 mg  $\text{kg}^{-1}$  (Pós).

A espessura das duas patas traseiras (uma com edema e outra sem edema) dos grupos tratados com os polissacarídeos, C, Dexa e CN foram medidas, com uso de uma paquímetro digital, após a administração de carragenina (tempo zero) e a cada hora, até completar 6 horas após indução de formação de edema. Os resultados foram expressos como o valor de espessura da pata com edema diminuído do valor de espessura da pata sem edema.

A atividade anti-inflamatória foi avaliada pela relação entre a espessura do edema de pata apresentado pelos grupos tratados com os polissacarídeos e tratado com Dexa em relação ao edema apresentado pelo grupo controle não tratado.

Para o polissacarídeo linear  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3)-ligada (G-PHW), foram realizados outros testes de avaliação de atividade biológica (itens 5.9.5 a 5.9.9), em função desta estrutura não ter sido caracterizada anteriormente em fungos basidiomicetos.

#### 5.9.5 Cultivo celular

Uma linhagem celular de monócitos humanos THP-1 (Banco de Células do Rio de Janeiro, Brasil) foi cultivado em meio de cultivo RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, cat. R8758) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco, gato 161010159) e penicilina/estreptomicina (100 U  $\text{mL}^{-1}$ ; 100 g  $\text{mL}^{-1}$ , respectivamente) (Sigma-Aldrich), em estufa a 37 °C com 5% de  $\text{CO}_2$ . O meio foi renovado duas vezes por semana.

#### 5.9.6 Diferenciação e estimulação dos macrófagos

Os monócitos THP-1 (500.000 células  $\text{mL}^{-1}$ ) foram induzidos à diferenciação a macrófagos por tratamento durante 48 h com 30 ng  $\text{mL}^{-1}$  de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA; Sigma-Aldrich) em placas de cultura de células de poliestireno de 24 poços (Costar) com 1 mL de suspensão celular em cada poço. Após 48 horas, o meio foi removido e substituído por meio fresco contendo a  $\beta$ -D-glucana(1 $\rightarrow$ 3)-ligada (G-

PHW) em concentração de 10, 50 e 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , em solução salina tamponada com fosfato (PBS, 50  $\mu\text{L}$ ), ou lipopolissacarídeo (1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) como controles negativo e pró-inflamatório, respectivamente.

Após a adição das soluções de tratamento, as células foram coletadas no tempo de 0, 3 e 6 horas e mantidos em tampão de lise a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para o passo seguinte. O valor no tempo zero (0 h) foi utilizado para normalizar os cálculos. Todos os testes foram realizados com a mesma quantidade de células ( $5 \times 10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$ ). O RNA total foi isolado a partir das células como se segue.

#### 5.9.7 Cinética da expressão de gene por PCR em tempo real

O RNA total foi isolado utilizando mini kit RNeasy (Qiagen, EUA) com um tratamento de DNase livre de RNase (Qiagen) durante 15 minutos, de acordo com as instruções do fabricante. O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de RNA isolado (1  $\mu\text{g}$ ) com kit de alta capacidade de RNA para cDNA (Applied Biosystems, EUA). Os níveis de expressão de cada gene foram medidos em triplicata, utilizando o mesmo conjunto de cDNA (diluída 1:5), na presença de corante fluorescente (iQ SYBR Green Supermix) usando o equipamento StepOne Plus<sup>TM</sup> (Applied Biosystems, EUA). Os testes foram realizados em volume de reação de 20  $\mu\text{L}$  com os pares de iniciadores específicos (CHANPUT *et al.*, 2010), e as condições de PCR em tempo real quantitativo foram realizadas como se segue: desnaturação a  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 10 min e amplificação de 40 vezes por ciclo a  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 15 s e  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 60 s. Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), actina (ACTB), e  $\beta$ -2-microglobulina foram usados como controles endógenos, e GAPDH foi escolhido para normalização. Todos os produtos de PCR foram sujeitos a uma análise de curva de fusão para verificar o produto de amplificação único. A expressão do RNA mensageiro relativa (mRNA) foi apresentada como descrito em Chanput *et al.* (2010): os valores foram expressos como o número de vezes de mudança em relação ao valor no ponto de tempo zero, calculada como  $\Delta\Delta\text{Ct}$  [ $\Delta\Delta\text{Ct} = 2 (\text{CtGAPDH} - \text{CtAmostra})$ ] (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). O q-PCR foi analisado duas vezes com cada uma das amostras (em triplicata), para avaliar o nível de expressão de mRNA de genes de citocinas pró-inflamatórias de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  e também da enzima relacionada ao processo inflamatório, a COX-2.

#### 5.9.8 Peritonite induzida por injeção intraperitoneal de LPS (lipopolissacarídeo bacteriano)

A peritonite foi induzida com lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), seguindo metodologia proposta por Borges *et al.* (2014b), com modificações. O LPS é um dos componentes principais da membrana externa de bactérias gram-negativas, que estimula a resposta imune inata e adquirida, resultando em uma alta rotatividade de populações de células T, levando à deficiência imunológica sistêmica (CRUZ-MACHADO, 2010). Este modelo de inflamação é caracterizado pelo recrutamento e ativação de leucócitos (células mononucleares e neutrófilos) que são responsáveis da liberação de mediadores pró-inflamatórios (NI *et al.*, 2010).

Os camundongos foram pré-tratados com uma solução veículo (solução salina a 0,9%, adicionada de solução de Me<sub>2</sub>SO a 5%, 10 mL kg<sup>-1</sup>), dexametasona (0,5 mg kg<sup>-1</sup>) ou β-D-glucana (1→3)-ligada (G-PHW) (1, 3 e 10 mg kg<sup>-1</sup>) por via i.p., 30 min antes da injeção de LPS (2 µg kg<sup>-1</sup>, i.p.). Um grupo controle recebeu apenas solução salina a 0,9% (10 mL kg<sup>-1</sup>, i.p.).

Quatro horas após a indução da peritonite, os camundongos foram sacrificados e a cavidade peritoneal foi aberta e lavada com 1 mL de solução salina estéril contendo heparina (25 UI mL<sup>-1</sup>). Em seguida, o fluido peritoneal foi recolhido para determinar o número total de leucócitos e a concentração de mieloperoxidase (MPO).

Uma alíquota do líquido peritoneal foi diluída com solução de Turk (1:20) e as contagens de leucócitos totais foram realizadas em câmara de Neubauer.

Para avaliar os níveis de MPO, amostras do líquido peritoneal foram adicionados ao tampão fosfato de potássio a 80 mM (pH 5,4) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB), e centrifugado a 11.000 g durante 20 min a 4 °C. Os níveis de MPO no sobrenadante foram determinadas na presença de 0,017% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina em dimetilformamida (TMB, 18,4 mM). A reação foi incubada a 37 °C durante 3 minutos e, em seguida, parada pela adição de acetato de sódio (1,46 M, pH 3,0). A absorbância foi medida utilizando um leitor de microplacas a 620 nm e os níveis de MPO foram expressos como unidades de densidade óptica (OD mL<sup>-1</sup>) (DA SILVA *et al.*, 2011).

## 5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As curvas cinéticas dos experimentos realizados em biorreator foram traçadas usando os valores de concentração de glucose, biomassa micelial e EPS, em triplicatas, comparando dois experimentos independentes. As curvas cinéticas foram obtidas usando-se o *software* Origin 8.0 PRO®.

Os resultados dos testes com animais foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média. A diferença estatística entre os grupos foi determinada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. Os gráficos foram elaborados utilizando-se o *software* Origin 8.0 PRO®.

Os resultados de cultivo celular foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de culturas, em duplicata, de duas experiências representativas. A diferença estatística foi determinada usando análise de variância de uma via (ANOVA) seguida por teste de Bonferroni. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 CINÉTICA DO PROCESSO FERMENTATIVO PARA O CULTIVO SUBMERSO

Cultivos submersos podem ser utilizados para se obter polissacarídeos num tempo mais curto, quando comparado com o processo de produção de corpos frutíferos de cogumelos, e na obtenção de grandes quantidades de produtos, quando necessário.

As vantagens da adaptação da tecnologia de cultivo líquido para processos de produção incluem o aumento na taxa de crescimento e conteúdo nutricional, redução no tempo de duração do ciclo de produção e aumento da automatização da planta de produção (FRIEL e McLOUGHLIN, 2000).

*Pleurotus sajor-caju* foi cultivado em biorreator utilizando meio POL modificado por Assis *et al.* (2013). Esta modificação consistiu na redução dos teores de sulfato de nitrogênio e de extrato de levedura.

Para o cultivo em biorreator foram analisados os parâmetros de concentração de glucose, de biomassa micelial e de exopolissacarídeos (EPS) em função do tempo de cultivo, sendo apresentadas as curvas cinéticas para estes parâmetros na Figura 19. A concentração de glucose diminuiu ao longo do tempo, enquanto a concentração de biomassa e EPS aumentou com o passar do tempo, indicando que o fungo *P. sajor-caju* utilizou a glucose como fonte de energia e promoveu o aumento de células e a síntese de exopolissacarídeos (FIGURA 19).

A partir dos dados cinéticos observa-se que, em aproximadamente 490 h restaram apenas 0,46 g L<sup>-1</sup> de glucose, sendo consumido 18,97 g L<sup>-1</sup> durante o processo de cultivo. Este consumo foi utilizado para o aumento da concentração de biomassa micelial e produção de EPS. A concentração máxima de EPS foi obtida em 256,5 h de cultivo (0,94 g L<sup>-1</sup>), sendo este tempo considerado como tempo de cultivo. No tempo de cultivo, a concentração de biomassa micelial foi de 3,07 g L<sup>-1</sup>.



A produtividade total para biomassa micelial foi de  $11,98 \text{ mg L}^{-1}$  e de  $3,68 \text{ mg L}^{-1}$  para EPS. O fator de conversão de glucose em biomassa micelial foi de  $0,21 \text{ g g}^{-1}$  e o fator de conversão de glucose em EPS foi de  $0,06 \text{ g g}^{-1}$ .

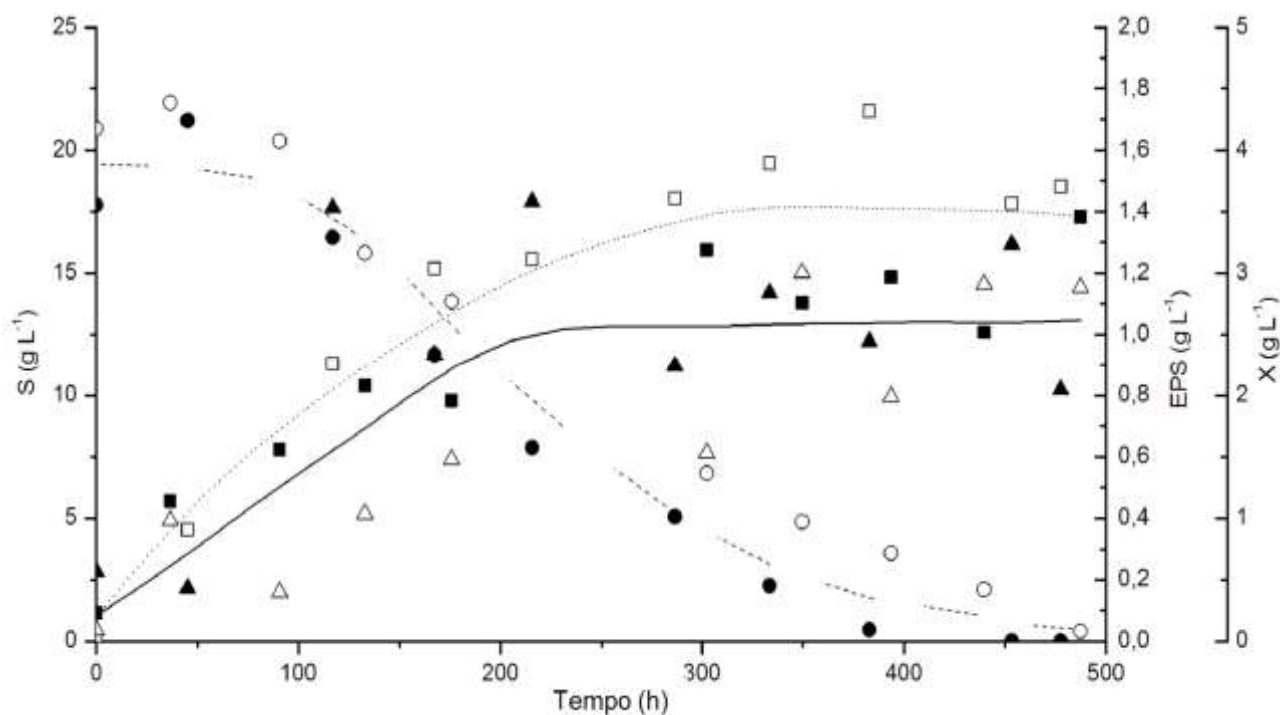


FIGURA 19 – CURVAS CINÉTICAS DE CONCENTRAÇÃO DE GLUCOSE (S ..... , ●○), DE BIOMASSA MICELIAL (X ..... , ■□) E DE EPS (EPS ——— , ▲△) POR TEMPO DE CULTIVO DE *P. sajor-caju*.

Os símbolos fechados e abertos referem-se às duplicatas. A linha tracejada refere-se à concentração de glucose (S), a linha pontilhada refere-se à concentração de biomassa micelial (X) e a linha contínua refere-se à concentração de EPS.

O cultivo realizado neste estudo foi classificado como tipo I, segundo a classificação de Gaden (BAILEY e OLLIS, 1986) para processos fermentativos, indicando que a produção (síntese) de EPS está associada ao aumento de concentração de biomassa micelial.

Utilizando cultivo submerso em frascos agitados com meio POL por 7 dias, Rosado *et al.* (2003) observaram uma concentração de EPS para *P. ostreatoroseus* de  $5,8 \text{ g L}^{-1}$  e de  $1,4 \text{ g L}^{-1}$  para *P. ostreatus* “florida”. Quando o meio foi preparado com

baixa concentração de nitrogênio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $2,5 \text{ g L}^{-1}$ ), os autores observaram um aumento da concentração de EPS ( $9,7 \text{ g L}^{-1}$ ) produzido por *P. ostreatoroseus*.

El-Enshasy *et al.* (2010) também estudaram a produção de EPS em cultivo submerso de *P. ostreatus* em frascos sob agitação. Como fontes de nitrogênio foram utilizados extrato de levedura ( $2 \text{ g L}^{-1}$ ) e peptona ( $2 \text{ g L}^{-1}$ ). Os autores observaram uma concentração máxima de EPS ( $0,69 \text{ g L}^{-1}$ ) após 240 h de cultivo. Quando o cultivo foi realizado em biorreator de 9 L de volume de trabalho, a concentração de EPS aumentou ( $1,12 \text{ g L}^{-1}$ ) após 216 h, permanecendo constante até o final do cultivo (350 h).

Utilizando quantidades menores de nitrogênio para o meio POL, com  $2,5 \text{ g L}^{-1}$  de sulfato de amônio e  $1,0 \text{ g L}^{-1}$  de extrato de levedura, em presença de carbonato de cálcio ( $1,0 \text{ g L}^{-1}$ ), com pH controlado em 4,0, Assis *et al.* (2013) cultivaram *P. sajor-caju* em biorreator com 4 L de volume de trabalho e obtiveram uma concentração de EPS de  $0,72 \text{ g L}^{-1}$  após 188,4 h de cultivo.

Utilizando um meio de cultivo com  $60 \text{ g L}^{-1}$  de xilose,  $6 \text{ g L}^{-1}$  de extrato de soja, 5 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 5 mM de  $\text{MgSO}_4$  para o cultivo submerso de *P. pulmonarius* em biorreator com volume de trabalho de 5 L, Shen *et al.* (2013) observaram uma concentração máxima de EPS de  $6,36 \text{ g L}^{-1}$ .

A concentração de EPS ( $0,94 \text{ g L}^{-1}$ ) foi similar aos valores observados nos trabalhos relatados, com exceção ao desenvolvido por Rosado *et al.* (2003) e Shen *et al.* (2013). Porém, no meio de cultivo deste trabalho foi retirado o extrato de levedura, em função do relato feito por Komura *et al.* (2010), que observaram que as mananas isoladas de cultivo submerso de duas espécies de cogumelos (*Ganoderma lucidum* e *Pleurotus spp.*) eram semelhantes às mananas isoladas de leveduras. Assim, estes autores sugeriram que a manana encontrada estava presente no extrato de levedura e não foi produzida pelos basidiomicetos estudados.

Observando, então, o relatado por Komura *et al.* (2010), neste trabalho a concentração de EPS é formada apenas por polissacarídeos produzidos por *P. sajor-caju*. Estes polissacarídeos foram caracterizados e estão apresentados na sequência deste trabalho.

## 6.2 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS

### 6.2.1 Manogalactana

O polissacarídeo do tipo manogalactana foi obtido a partir do caldo de cultivo, da biomassa micelial e do corpo frutífero. A Figura 20 mostra o processo de extração da manogalactana do caldo de cultivo de *Pleurotus sajor-caju*.

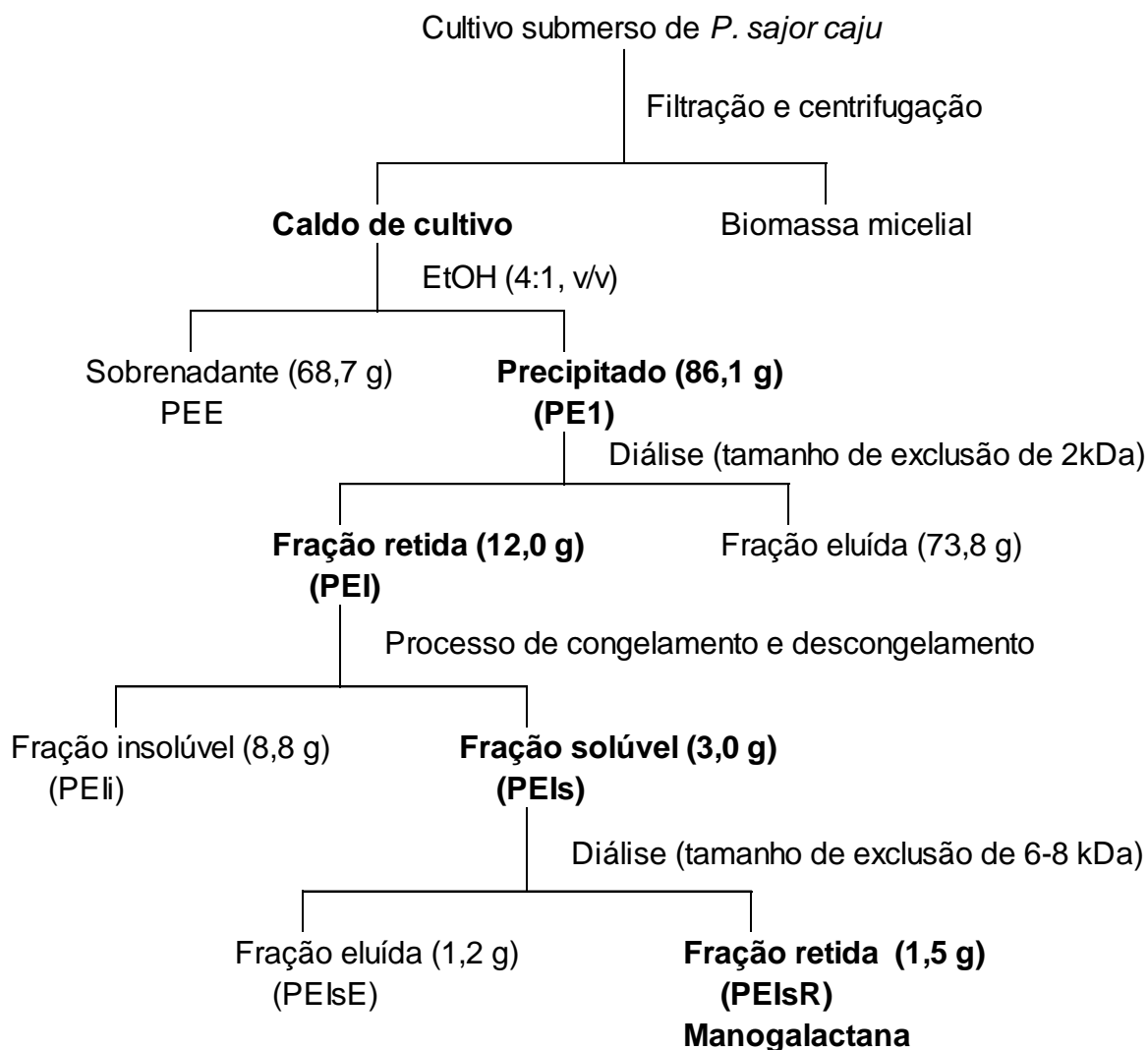


FIGURA 20 – FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DA MANOGALACTANA EXTRAÍDA DO CALDO DE CULTIVO DE *P. sajor-caju*.

A fração retida em diálise do precipitado etanólico do caldo de cultivo (PEI) foi congelada e descongelada para a separação da fração solúvel (PEIs) e fração insolúvel em água fria (PEli). A fração solúvel apresentou manose (43,6%), galactose

(28,8%), 3-O-metil-galactose (22,9%) e glucose (4,6%) como composição monossacarídica. A posição do grupo metil da galactose foi confirmada pela presença dos fragmentos com  $m/z$  de 130 e 190 na análise de CG-MS, usando  $\text{NaBD}_4$  como agente de redução na preparação dos acetatos de alditóis (SASSAKI *et al.*, 2005a).

Esta fração solúvel (PEIs) foi solubilizada em água e dialisada em membrana de tamanho de exclusão de 6-8 kDa, gerando uma fração retida (PEIsR) e uma fração eluída (PEIsE).

Nas análises de perfil de eluição por HPSEC (FIGURA 21) realizadas com as frações PEI, PEIs e PEIsR, pode-se observar que a fração PEIsR apresentou-se homogênea, com massa molar de  $6,4 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$  ( $dn/dc=0,141$ ). A fração PEIsR apresentou composição monossacarídica constituída por manose (37,0%), galactose (23,3%) e 3-O-metil-galactose (39,7%). Smiderle *et al.* (2012) mencionaram a presença de manogalactanas como exopolissacarídeo de *P. pulmonarius*, em função da presença de manose, 3-O-metil-galactose e galactose na composição monossacarídica. A análise de metilação demonstrou que PEIsR contém um polissacarídeo altamente ramificado em função da presença de 35,2% de unidades de Galp 2,6-di-O-substituídas, determinada pela presença do derivado 3,4-Me<sub>2</sub>-Galp. Outras unidades de galactoses estão 6-O-substituída (2,3,4-Me<sub>3</sub>-Galp = 31,1%). As ramificações são constituídas por unidades terminais não-redutores de manose, de acordo com a presença de 2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Manp (33,7%). Estes dados indicam a presença de manogalactana na fração PEIsR.

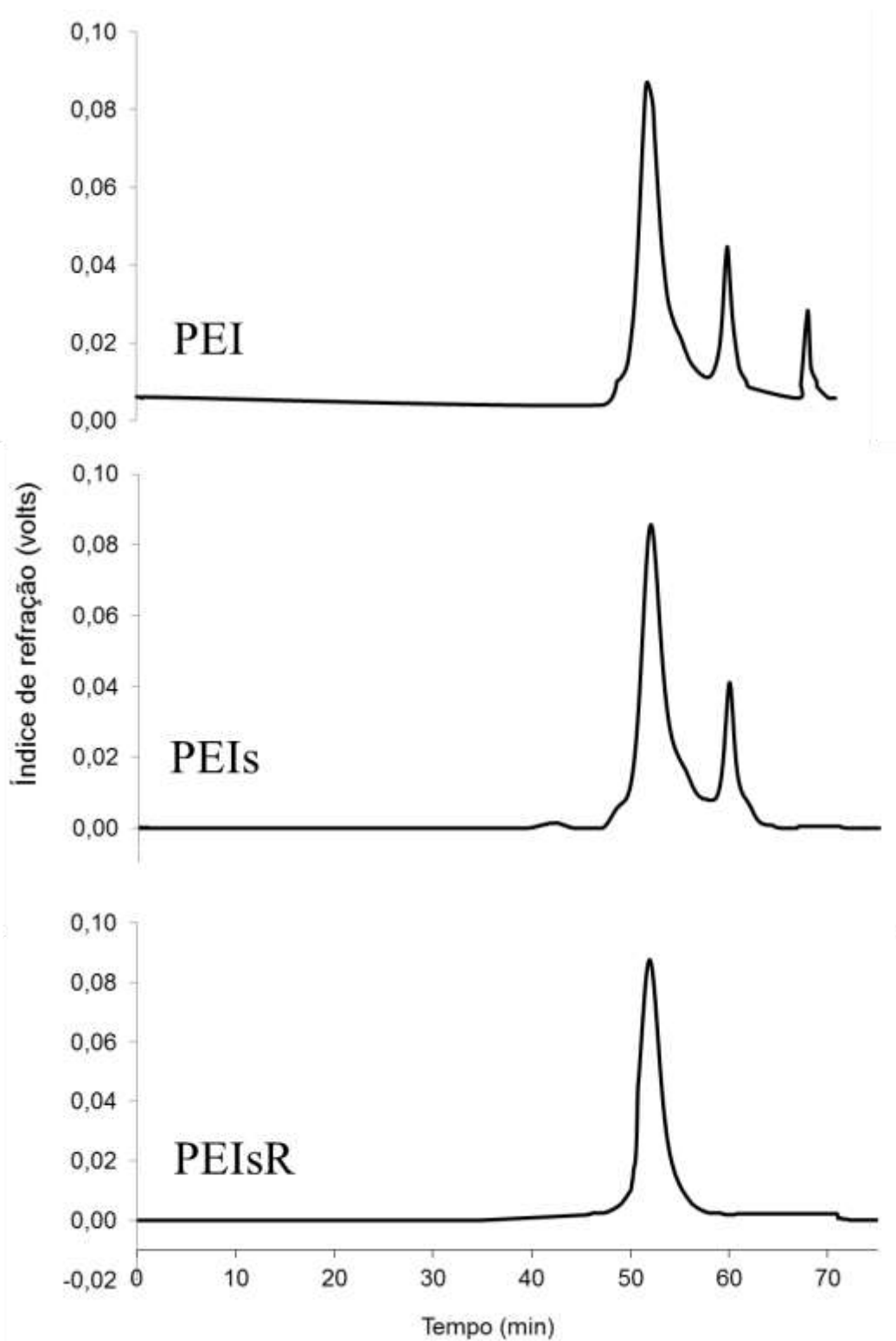


FIGURA 21 – PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC DAS FRAÇÕES PEI, PEIs E PEIsR DERIVADAS DO CALDO DE CULTIVO DE *P. sajor-caju*.

A análise de RMN de PEIsR foi realizada utilizando HSQC e TOCSY 1D seletivo (FIGURA 22) e os assinalamentos de seus  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  são apresentados na Tabela 3.

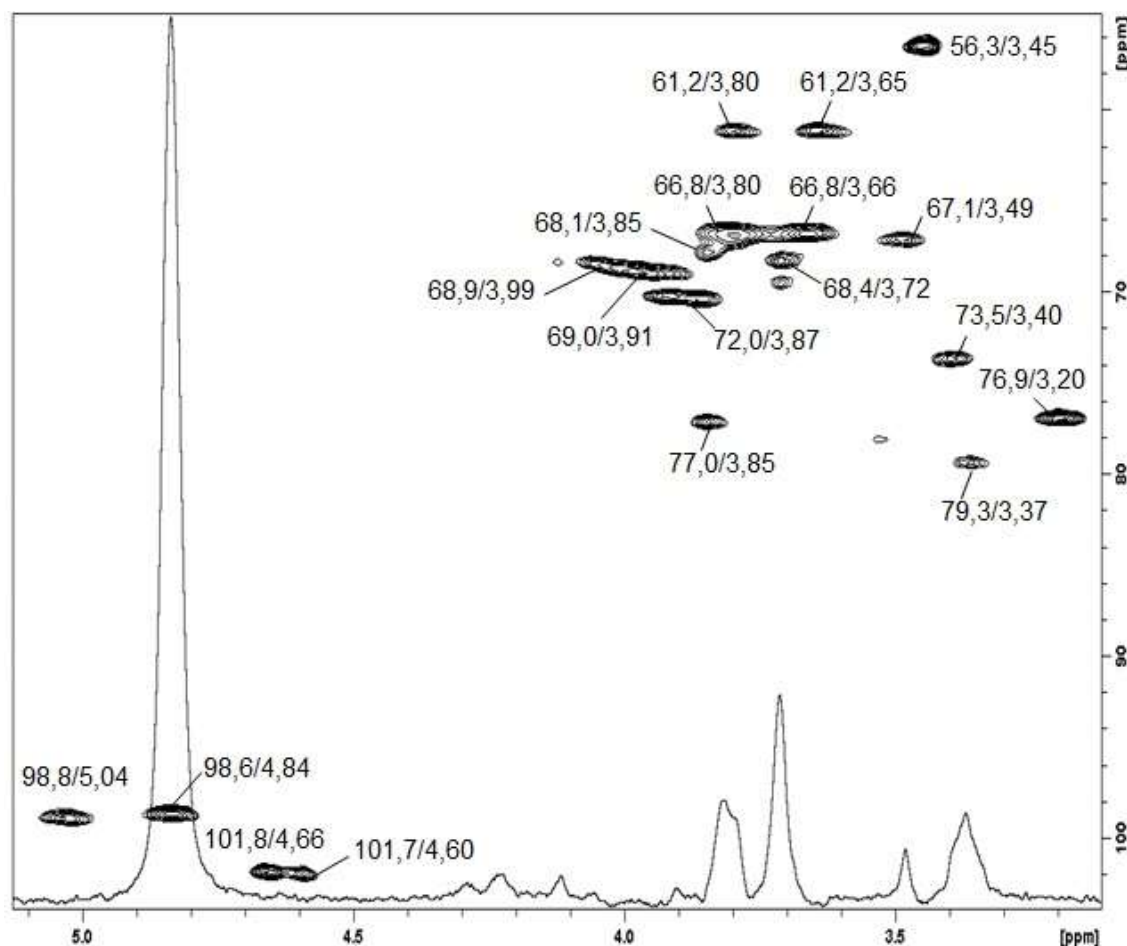


FIGURA 22 – ESPECTRO DE HSQC, SOBREPOSTO POR TOCSY 1D SELETIVO DA FRAÇÃO PEIsR OBTIDA DO CALDO DE CULTIVO DE *P. sajor-caju*.

Amostra solubilizada em  $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$  ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ), analisada a  $70^\circ\text{C}$ ; deslocamentos químicos expressos em  $\delta$  (ppm).

As configurações  $\alpha$  e  $\beta$  dos monossacarídeos foram confirmadas pelo valor das constantes de acoplamento ( $J_{\text{C-1,H-1}}$ ) (SASSAKI *et al.*, 2005b). As unidades de Galp apresentaram  $J_{\text{C-1,H-1}}$  de 170 Hz, confirmando a configuração do tipo  $\alpha$  e as unidades de Manp apresentaram  $J_{\text{C-1,H-1}}$  de 162 Hz, correspondendo à configuração  $\beta$  (ROSADO *et al.*, 2003; SASSAKI *et al.*, 2005b; SMIDERLE *et al.*, 2008b).

TABELA 3 – ASSINALAMENTOS DE  $^{13}\text{C}$  E  $^1\text{H}$  DA MANOGALACTANA (PEIsR) ISOLADA DO CALDO DE CULTIVO DE *P. sajor-caju*.

Resíduos <sup>a</sup>	Deslocamentos químicos (ppm)						CH <sub>3</sub> O
	C-1 H-1	C-2 H-2	C-3 H-3	C-4 H-4	C-5 H-5	C-6 H-6	
→2,6)-α-D-Galp-(1→	98,8 5,04	77,0 3,85	69,0 3,91	68,1 3,85	68,9 3,99	66,8 3,80 e 3,66	
→6)-3-O-Me-α-D-Galp-(1→	98,6 4,84	68,4 3,72	79,3 3,37	67,3 3,81	68,9 3,99	66,8 3,80 e 3,66	56,3 3,45
β-D-Manp-(1→	101,8 e 101,7 4,66 e 4,60	70,2 3,87	73,5 3,40	67,1 3,49	76,9 3,20	61,2 3,80 e 3,65	

<sup>a</sup> Assinalamentos com base no espectro de HSQC.

O espectro de HSQC da manogalactana (FIGURA 22) mostrou os sinais em  $\delta$  98,8/5,04, 77,0/3,85 e 66,8/3,80 e 66,8/3,66 ppm correspondentes aos C-1/H-1, C-2/H-2 e C-6/H-6 de unidades de α-D-Galp 2,6-di-O-substituídas, respectivamente, e sinais em  $\delta$  98,6/4,84, 79,3/3,37 e 66,8/3,80 e 66,8/3,66 ppm, correspondentes aos C-1/H-1, C-3/H-3 e C-6/H-6 de unidades de 3-O-Me-α-D-Galp 6-O-substituídas, respectivamente. O sinal do grupo metil destas unidades foi observado em  $\delta$  56,3/3,45 ppm. Os sinais correspondentes ao C-1/H-1 das unidades terminais não-redutores de β-D-Manp foram observadas em  $\delta$  101,8/4,60 e 101,7/4,66 ppm (FIGURA 22). A presença de dois sinais relativos ao C-1/H-1 das unidades de Manp sugere que estas unidades estão em dois ambientes químicos distintos na estrutura da manogalactana.

De acordo com as análises de RMN, as unidades de 3-O-Me-α-D-Galp 6-O-substituídas não são substituídas em O-2, pois o sinal de C2 aparece em  $\delta$  68,4/3,72 ppm. Além disso, as unidades de α-D-Galp 2,6-di-O-substituídas não apresentam grupos metil em O-3, pois o sinal de C3 para estas unidades aparece em  $\delta$  69,0/3,91 ppm. Portanto, as unidades terminais não-redutores de β-D-Manp estão ligadas em O-2 nas unidades de α-D-Galp não substituídas por grupos metil.

A estrutura parcial da manogalactana (PEIsR) isolada do caldo de cultivo de *P. sajor-caju* está apresentado na Figura 23.



FIGURA 23 – ESTRUTURA PARCIAL DA MANOGALACTANA OBTIDA DO CALDO DE CULTIVO DE *P. sajor-caju*.

Smiderle *et al.* (2012) mencionaram a presença de manogalactanas no exopolissacarídeo de *P. pulmonarius*. Eles isolaram do EPS uma fração (FSEPS) constituída por manose, 3-O-Me-galactose e galactose, sugerindo assim a presença da manogalactana, porém a fração não foi purificada e caracterizada quimicamente. Portanto, esta é a primeira vez que uma manogalactana produzida por cultivo submerso de fungo do gênero *Pleurotus* foi caracterizada quimicamente.

Outras duas manogalactanas foram isoladas neste trabalho, uma oriunda da biomassa micelial proveniente do cultivo submerso, e outra isolada dos corpos frutíferos. A Figura 24 esclarece o fluxograma de obtenção da manogalactana derivada da biomassa micelial.

A biomassa micelial foi submetida à deslipidificação com uma mistura de clorofórmio:metanol (2:1, v:v) e o resíduo gerado foi adicionado de água fria, mantido em agitação a 4 °C, para a obtenção da fração solúvel em água fria (CW). Os polissacarídeos presentes neste extrato foram precipitados pela adição de etanol e separados por centrifugação. Em seguida, foi realizada uma diálise com membrana de limite de exclusão de 2 kDa, originando uma fração eluída e uma fração retida (ICW) sendo que, esta última, passou pelo processo de congelamento e descongelamento. Deste processo, foram obtidas uma fração insolúvel em água fria e outra solúvel em água fria (SICW).



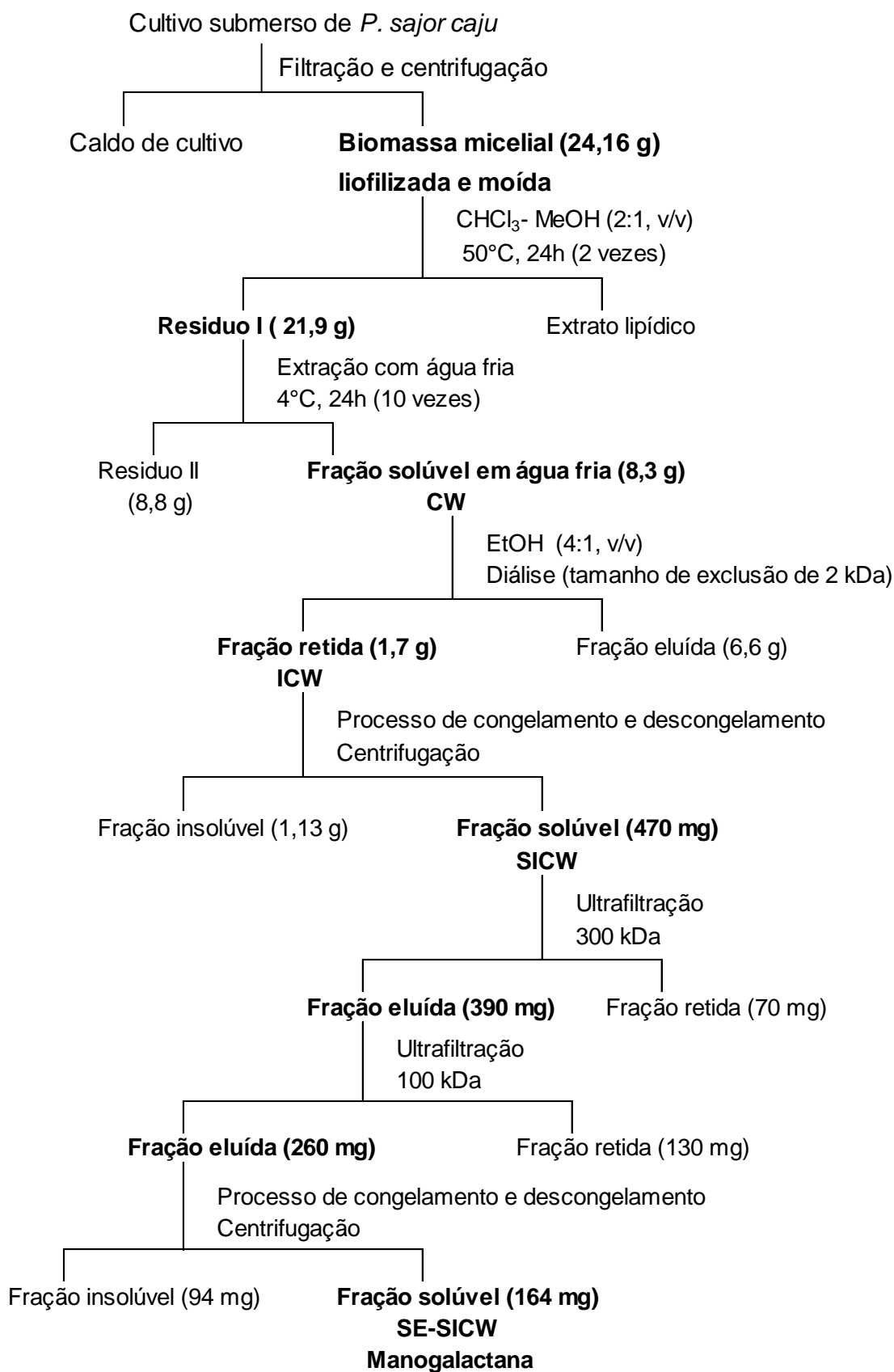


FIGURA 24 – FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA MANOGALACTANA DERIVADA DA BIOMASSA MICELIAL DE *P. sajor-caju*.

A fração SICW (FIGURA 25-A) demonstrou um perfil de eluição heterogêneo, observado por análise de HPSEC, e mostrou composição monossacarídica de 13,1% de 3-O-metil-galactose, 18,1% de galactose, 24,1% de manose e 44,7% de glucose. Para purificar este polímero, foram realizadas duas ultrafiltrações, com membranas de 300 kDa e 100 kDa, sucessivamente, sendo a fração eluída na membrana de 300 kDa, submetida a nova ultrafiltração na membrana de 100 kDa. A fração eluída na membrana de 100 kDa foi então submetida ao processo de congelamento e descongelamento e a fração solúvel em água fria (SE-SICW) apresentou um perfil de eluição homogêneo (FIGURA 25-B), massa molar de  $4,5 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$  ( $dn/dc$  utilizado foi de 0,135), e composição monossacarídica de 16,6% de 3-O-metil-galactose, 27,6% de manose e 55,8% de galactose. A análise de metilação demonstrou que SE-SICW contém um polissacarídeo com 23,1% de unidades de Galp 2,6-di-O-substituídas (3,4-Me<sub>2</sub>-Galp), 25,6% de unidades terminais não-redutores de Manp e 51,3% de unidades de Galp 6-O-substituídas (2,3,4-Me<sub>3</sub>-Galp), condizente com uma manogalactana.

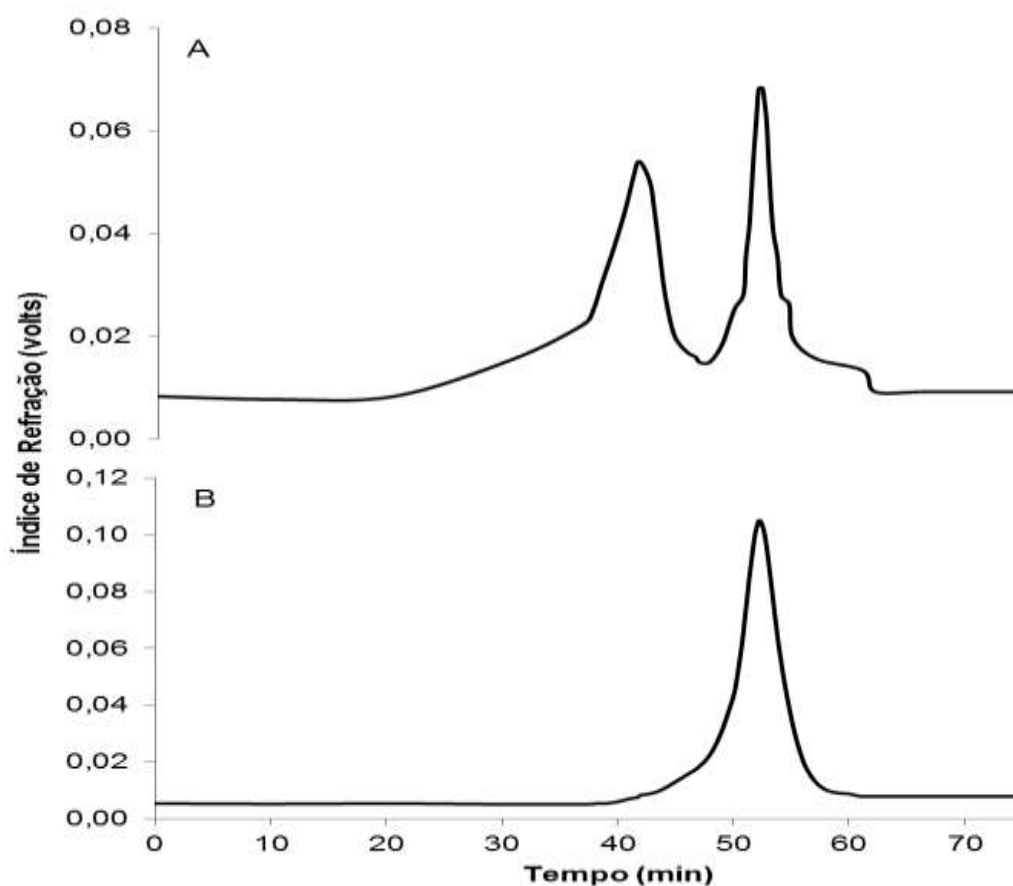


FIGURA 25 – PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC DAS FRAÇÕES SICW (A) E SE-SICW (B), DERIVADAS DA BIOMASSA MICELIAL DE *P. sajor-caju*.

O processo de extração da manogalactana de corpos frutíferos (FIGURA 26) seguiu procedimento semelhante ao utilizado para a biomassa até a obtenção da fração solúvel em água fria (SCW), resultante do processo de congelamento e descongelamento.

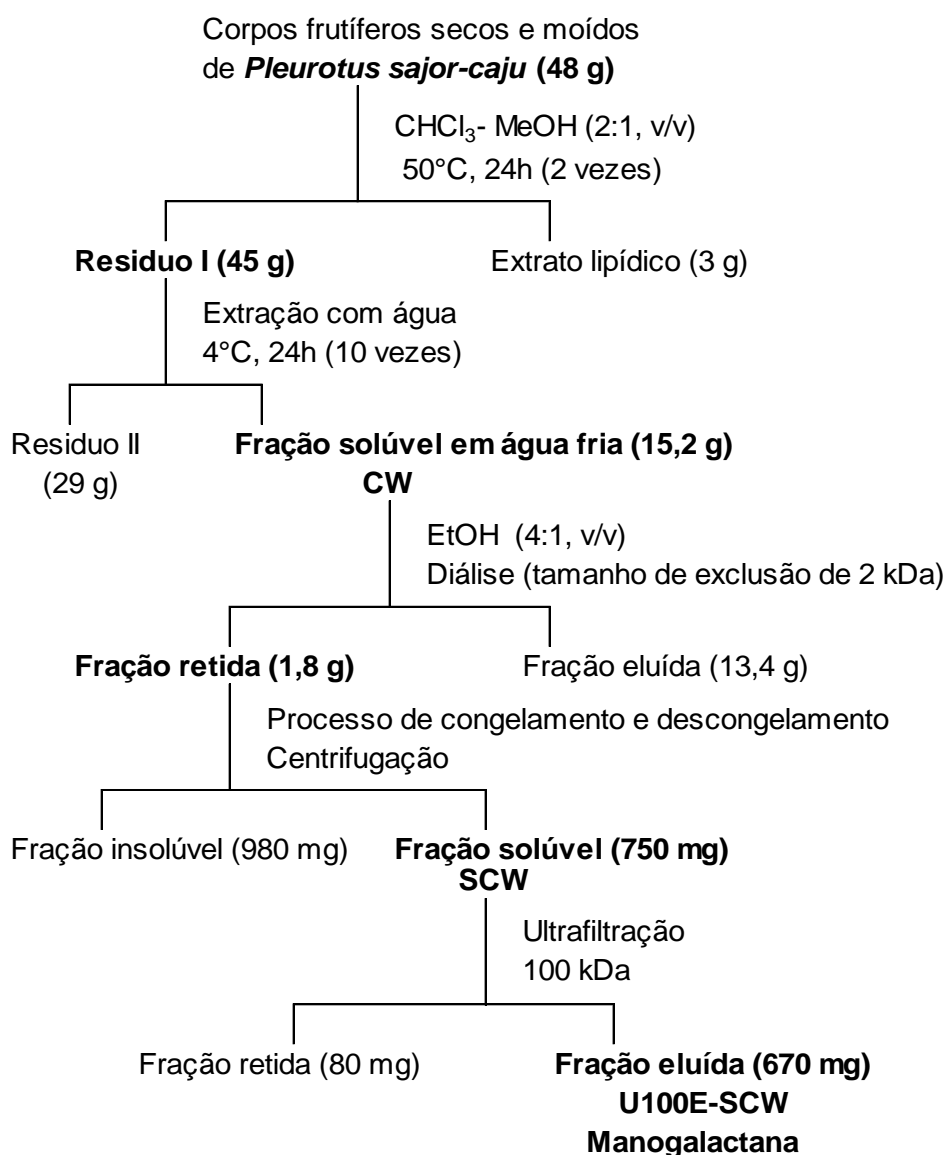


FIGURA 26 – FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA MANOGALACTANA, DERIVADA DE CORPOS FRUTÍFEROS DE *P. sajor-caju*.

A análise de perfil de eluição por HPSEC para a fração SCW (FIGURA 27-A) mostrou um perfil heterogêneo. SCW apresentou como composição monossacarídica 29,3% de galactose, 13,4% de 3-O-metil-galactose, 39,2% de manose e 18,1% de glucose. A fração SCW foi fracionada por ultrafiltração em membrana de 100 kDa em uma fração retida e uma fração eluída (U100E-SCW). A fração eluída apresentou um perfil de eluição heterogêneo em HPSEC (FIGURA 27-B), composição monossacarídica de 23,7% de 3-O-metil-galactose, 26,1% de manose e 50,1% de galactose e a presença de 24,3% de unidades Galp 2,6-di-O-substituídas, indicado pela presença do derivado 3,4-Me<sub>2</sub>-Galp, 52,3% de unidades Galp 6-O-substituídas (2,3,4-Me<sub>3</sub>-Galp) e 23,4% de unidades terminais não-redutores de Manp, sugerindo a presença de uma manogalactana, que apresentou massa molar de  $3,3 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$  ( $dn/dc$  utilizado foi de 0,135).

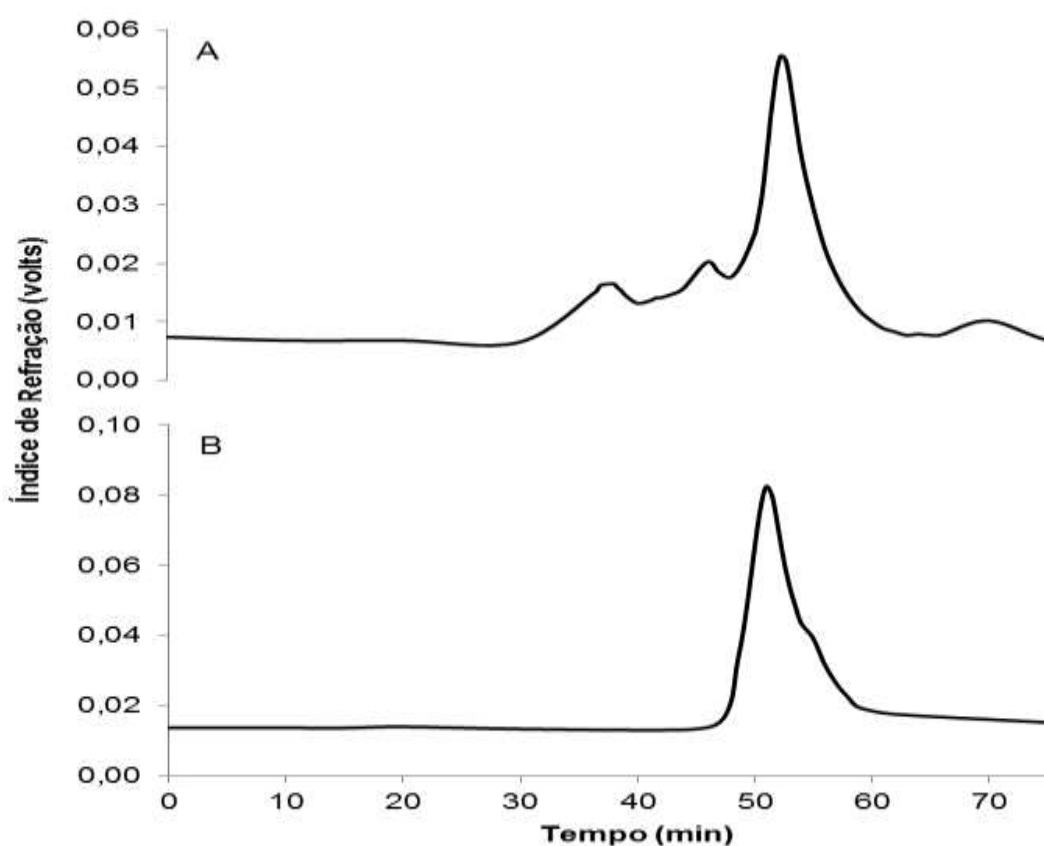


FIGURA 27 – PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC DAS FRAÇÕES SCW (A) E U100E-SCW (B), DERIVADAS DOS CORPOS FRUTÍFEROS DE *P. sajor-caju*.

Na Tabela 4 estão agrupados os resultados das análises de composição monossacarídica das frações PEIsR, SE-SICW e U100E-SCW, obtidas do caldo de cultivo, da biomassa micelial e dos corpos frutíferos de *P. sajor-caju*, respectivamente e de outras manogalactanas de corpos frutíferos de *P. ostreatoroseus*, *P. ostreatus* “florida” (ROSADO *et al.*, 2003) e *P. pulmonarius* (SMIDERLE *et al.*, 2008b).

TABELA 4 - RESULTADOS DAS ANÁLISES DE COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS MANOGALACTANAS DERIVADAS DE CALDO DE CULTIVO (PEIsR), DA BIOMASSA MICELIAL (SE-SICW) E DE CORPOS FRUTÍFEROS (U100E-SCW) DE *P. sajor-caju* E DE CORPOS FRUTÍFEROS DE *P. ostreatoroseus*, *P. ostreatus* “florida” e *P. pulmonarius*.

Composição monossacarídica	Manose	3-O-Me-galactose	Galactose
PEIsR	37,0 %	39,7 %	23,3 %
SE-SICW	27,6 %	16,6 %	55,8 %
U100E-SCW	26,1 %	23,7 %	50,1 %
<i>P. ostreatoroseus</i>	36,3 %	9,8 %	53,9 %
<i>P. ostreatus</i> “florida”	39,0 %	5,8 %	55,2 %
<i>P. pulmonarius</i>	32,0 %	13,0 %	55,0 %

Em relação à composição monossacarídica das três frações pode-se observar que a quantidade de manose, 3-O-metil-galactose e galactose das frações derivadas da biomassa micelial e do corpo frutífero são semelhantes entre si. Entretanto quando comparadas com a manogalactana obtida do caldo de cultivo, percebe-se quantidades menores de galactose mas quantidades maiores de 3-O-metil-galactose, demonstrando que a manogalactana do caldo de cultivo apresenta uma cadeia com mais unidades de galactoses metiladas do que as manogalactanas obtidas da biomassa micelial e do corpo frutífero.

Quando compara-se a composição monossacarídica de manogalactanas dos corpos frutíferos de *P. ostreatoroseus*, *P. ostreatus* “florida” (ROSADO *et al.*, 2003) e *P. pulmonarius* (SMIDERLE *et al.*, 2008b) com as obtidas de biomassa micelial (SE-SICW) e corpos frutíferos (U100E-SCW) neste trabalho, percebe-se que diferentes

espécies de *Pleurotus* tem apresentado um baixo teor de unidades de galactose metiladas. O maior teor de galactose metilada foi obtida do caldo de cultivo.

Os espectros de HSQC das manogalactanas de caldo de cultivo (PEIsR), biomassa micelial (SE-SICW) e corpos frutíferos (U100E-SCW) apresentaram grande semelhança de sinais em todas as regiões (FIGURA 28).

De acordo com os resultados obtidos, é possível afirmar que a manogalactana presente no corpo frutífero pode ser obtida a partir do caldo de cultivo e da biomassa micelial do cultivo líquido, uma forma de cultivo mais controlado e rápido se comparado ao cultivo sólido.

Outros autores relataram a presença de manogalactanas nos corpos frutíferos de cogumelos do gênero *Pleurotus*. Zhang *et al.* (2013a) isolaram uma manogalactana do extrato aquoso quente de *P. eryngii* com massa molar de  $1,88 \times 10^4$  g mol<sup>-1</sup>. Partindo do extrato aquoso quente de *P. geesteranus*, Zhang *et al.* (2013b) encontraram uma manogalactana com cadeia principal formada por unidades de  $\alpha$ -D-Galp e 3-O-Me- $\alpha$ -D-Galp (1→6)-ligadas, com ramificações em O-2 por unidades de terminais não-redutores de Manp, que apresentou massa molar de  $1,3 \times 10^4$  g mol<sup>-1</sup>. Smiderle *et al.* (2008b) caracterizaram uma manogalactana isolada de *P. pulmonarius* com massa molecular de  $2,4 \times 10^4$  g mol<sup>-1</sup>, formado por unidades de  $\alpha$ -D-Galp e 3-O-Me- $\alpha$ -D-Galp (1→6)-ligadas que são parcialmente substituídas em O-2 por unidades de  $\beta$ -D-Manp.

Com base neste estudo e relatos anteriores, parece que manogalactanas parcialmente metiladas são comuns ao gênero *Pleurotus*.

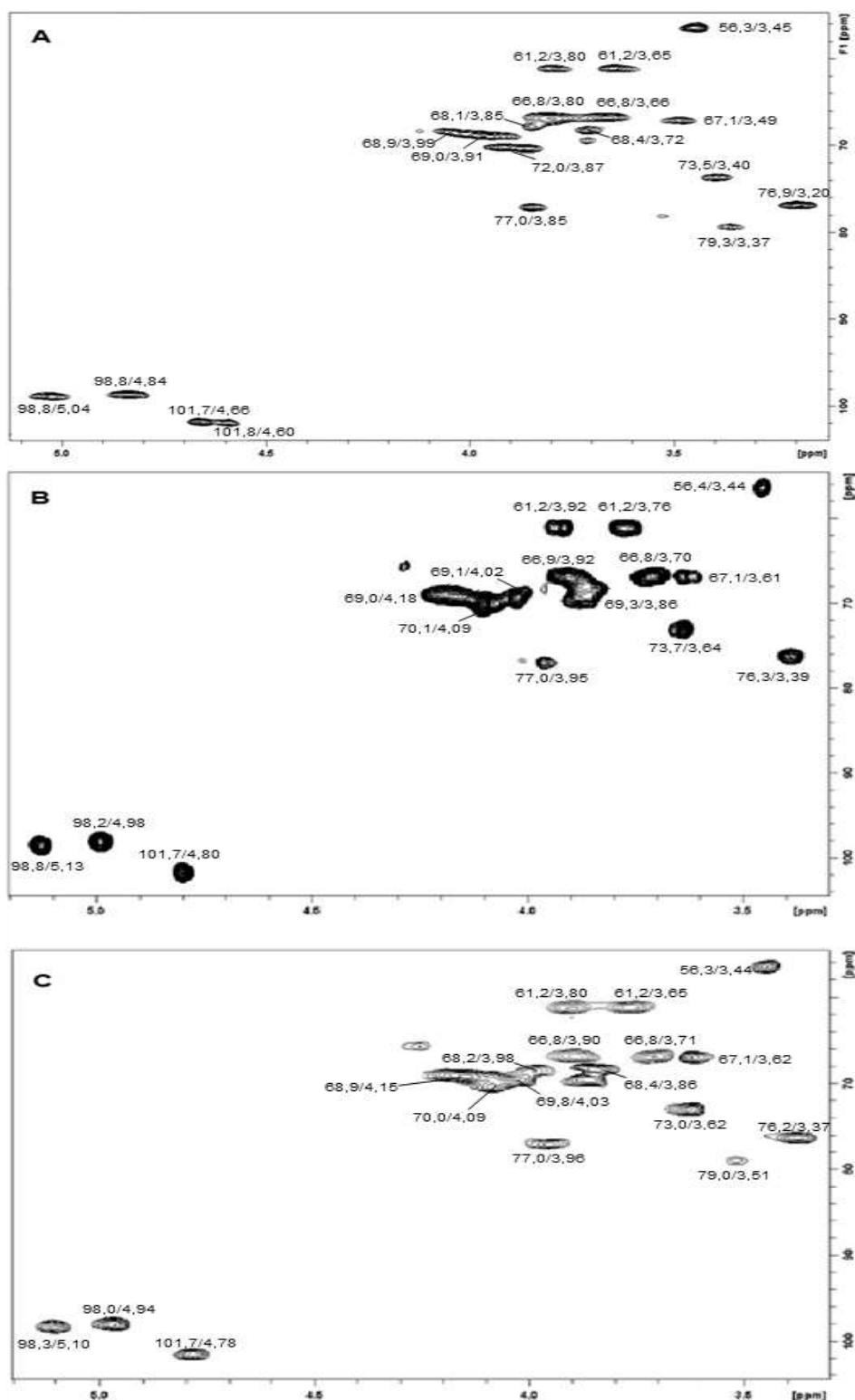


FIGURA 28 – ESPECTRO DE HSQC DAS FRAÇÕES PEIsR (CALDO DE CULTIVO-A), SE-SICW (BIOMASSA MICELIAL-B) E U100E-SCW (CORPOS FRUTÍFEROS-C) OBTIDOS DE *P. sajor-caju*.

Amostras solubilizadas em  $\text{D}_2\text{O}$  ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ), analisadas a  $70^\circ\text{C}$ ; deslocamentos químicos expressos em  $\delta$  (ppm).

## 6.2.2 Glucanas

Neste trabalho foram obtidas glucanas do corpo frutífero e da biomassa micelial. De ambos foram purificadas glucanas ramificadas (1→3),(1→6)-ligadas e glucanas lineares (1→3)-ligadas. A seguir são apresentados os resultados para a purificação e caracterização de cada um destes polissacarídeos.

### 6.2.2.1 Glucana (1→3),(1→6)-ligada

Os corpos frutíferos obtidos por cultivo sólido em palha de folha de bananeira foram congelados, liofilizados, moídos e deslipidificados. O resíduo I (corpos frutíferos deslipidificados) foi utilizado para a extração aquosa a frio, gerando a fração solúvel em água fria, de onde foi isolado e caracterizado uma manogalatana (relatada no item 6.2.1).

Após a extração aquosa a frio, o material insolúvel restante (resíduo II) foi colocado em água fervente para a obtenção da fração solúvel em água quente (HW). Esta fração foi concentrada sob baixa pressão e houve a formação de duas fases que foram separadas por centrifugação, originando a fração solúvel e a fração insolúvel em água, chamada de fração gel (GHW). A Figura 29 traz os processos para a purificação das glucanas obtidas a partir de corpos frutíferos de *P. sajor-caju*.



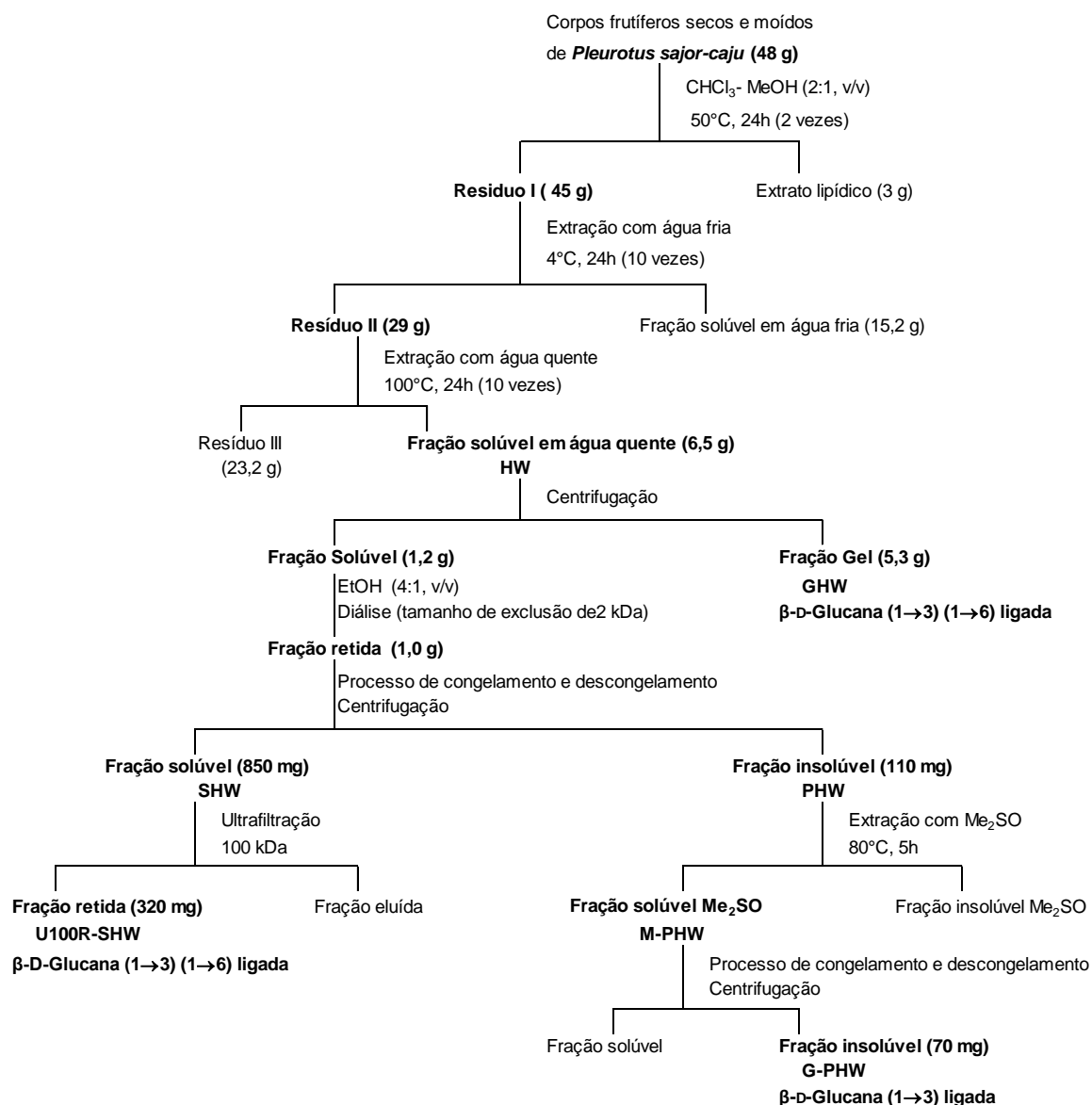


FIGURA 29 – FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DAS GLUCANAS PRESENTES NOS CORPOS FRUTÍFEROS DE *P. sajor-caju*.

A fração gel GHW apresentou somente glucose em sua composição e a análise de metilação apresentou 35,1 % do derivado 2,4,6-Me<sub>3</sub>-Glc<sub>p</sub>, indicando a presença de unidades de Glc<sub>p</sub> 3-O-substituídas. A presença de 32,0% do derivado 2,4-Me<sub>2</sub>-Glc<sub>p</sub> indicou a presença de unidades de Glc<sub>p</sub> 3,6-di-O-substituídas, demonstrando o alto grau de ramificação deste polímero. Comprovando a ramificação deste polímero, foram identificados 32,9% do derivados 2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Glc<sub>p</sub>, correspondente a unidades terminais não-redutores de Glc<sub>p</sub>.

O espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  de GHW (FIGURA 30) apresenta os sinais em  $\delta$  102,6 e 102,5 ppm referentes aos carbonos anoméricos, sinais característicos de substituição em O-3 ( $\delta$  86,3/85,9/85,7 ppm) e o espectro de HSQC (FIGURA 31) demonstra as unidades de glucose substituída em O-6 ( $\delta$  68,1 ppm).

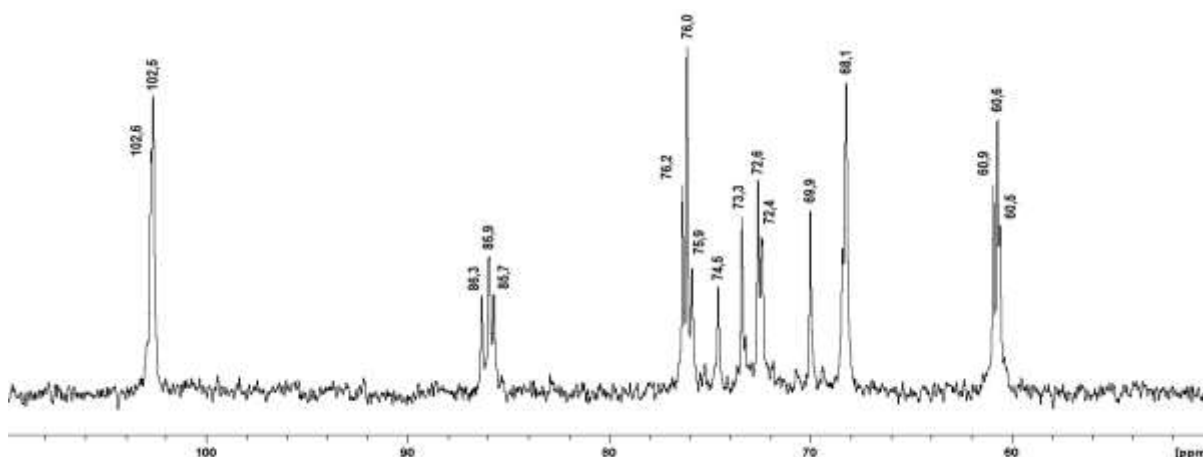


FIGURA 30 – ESPECTRO DE RMN- $^{13}\text{C}$  DA FRAÇÃO GEL GHW, DERIVADA DO EXTRATO AQUOSO QUENTE DOS CORPOS FRUTÍFEROS DE *P. sajor-caju*.

Amostra solubilizada em  $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$  ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ), analisada a  $70^\circ\text{C}$ ; deslocamentos químicos expressos em  $\delta$  (ppm).

Analisando o espectro de HSQC da fração gel GHW (FIGURA 31), observam-se sinais correspondentes a C-1/H-1 das unidades de  $\beta$ -D-Glcp 3-O-substituídas e  $\beta$ -D-Glcp 3,6-di-O-substituídas (ambos em  $\delta$  102,5/4,43 ppm) e sinais correspondentes às unidades de terminais não-redutores de  $\beta$ -D-Glcp ( $\delta$  102,6/4,13 ppm). O sinal em  $\delta$  85,9/3,39 ppm refere-se à substituição em O-3 nas unidades de  $\beta$ -D-Glcp. Sinais em  $\delta$  60,6/3,61;3,37 ppm correspondem ao C-6/H-6 das unidades de  $\beta$ -D-Glcp 3-O-substituídas e de terminais não-redutores de  $\beta$ -D-Glcp, enquanto os sinais em  $\delta$  68,1/3,97;3,46 ppm são atribuídos ao C-6/H-6 das unidades de  $\beta$ -D-Glcp 3,6-di-O-substituídas.

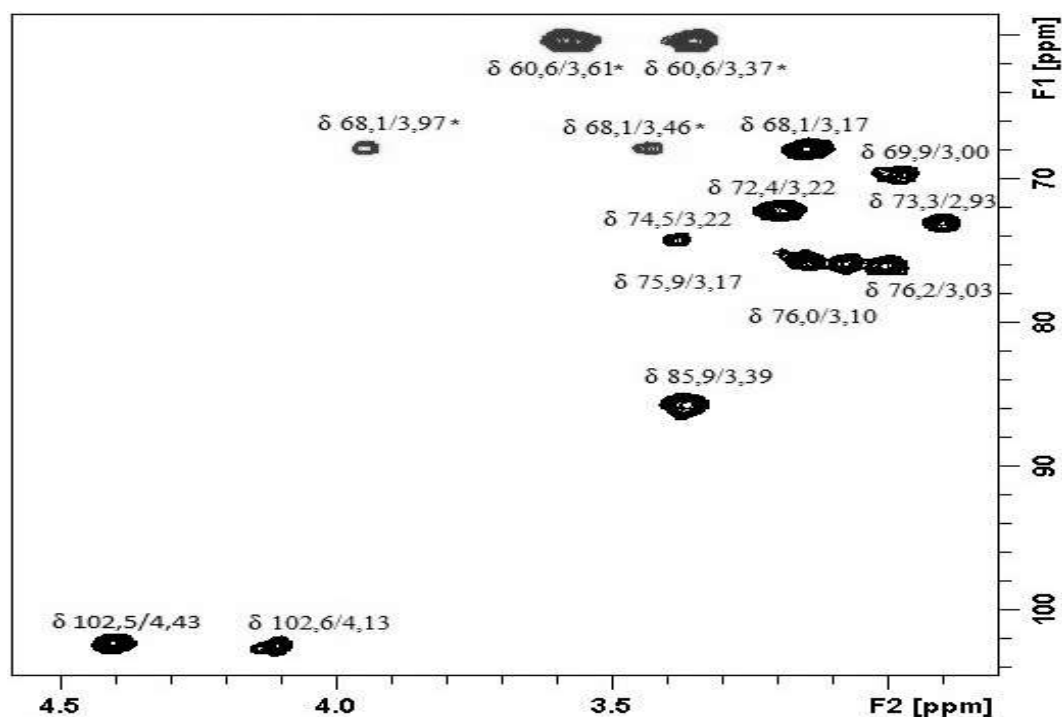


FIGURA 31 – ESPECTRO DE HSQC DA FRAÇÃO GEL GHW, DERIVADA DO EXTRATO AQUOSO QUENTE DOS CORPOS FRUTÍFEROS DE *P. sajor-caju*.

Amostra solubilizada em  $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$  ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ), analisada a  $70^\circ\text{C}$ ; deslocamentos químicos expressos em  $\delta$  (ppm). \*Sinais que inverteram na análise de HSQC DEPT.

A Tabela 5 mostra os assinalamentos químicos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da fração gel GHW elaborada a partir do espectro de HSQC (FIGURA 31).

TABELA 5 – ASSINALAMENTOS DE  $^1\text{H}$  E  $^{13}\text{C}$  DA FRAÇÃO GEL (GHW) ISOLADA DOS CORPOS FRUTÍFEROS DE *P. sajor-caju*.

Resíduos <sup>a</sup>	Deslocamentos químicos (ppm)					
	C-1 H-1	C-2 H-2	C-3 H-3	C-4 H-4	C-5 H-5	C-6 H-6
$\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow$	102,5 4,43	72,4 3,22	85,9 3,39	68,1 3,17	75,9 3,17	60,6 3,61 e 3,37
$\rightarrow 3,6)\text{-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow$	102,5 4,43	72,4 3,22	85,7 3,39	68,1 3,17	74,5 3,41	68,1 3,97 e 3,46
$\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow$	102,6 4,13	73,3 2,93	76,2 3,03	69,9 3,00	76,0 3,10	60,6 3,61 e 3,37

<sup>a</sup> Assinalamentos com base no espectro de HSQC.

Com o objetivo de comprovar o tipo de ligação da cadeia principal foi realizada a degradação controlada de Smith seguida de hidrólise ácida parcial na fração GHW. O espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  da fração resistente à degradação controlada de Smith é apresentado na Figura 32.

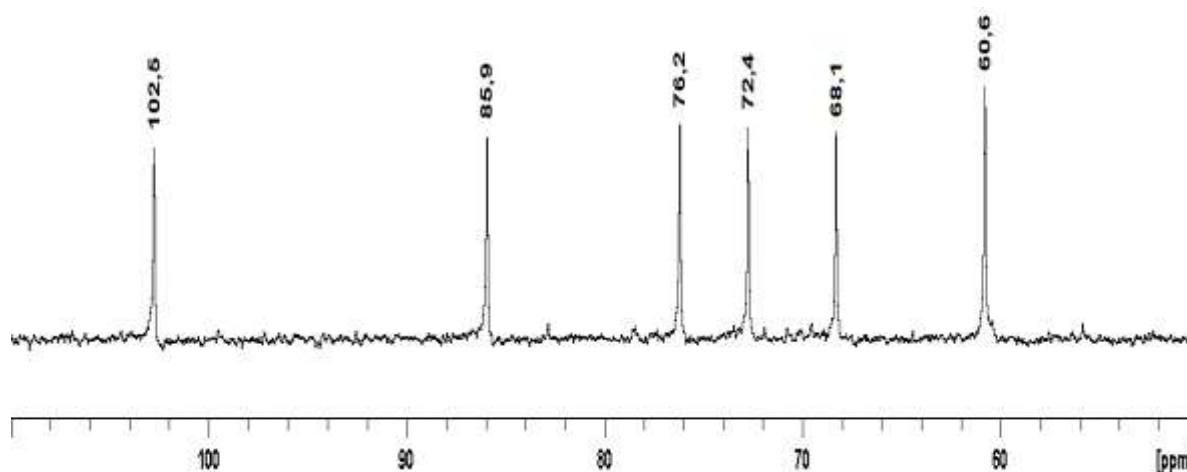


FIGURA 32 – ESPECTRO DE RMN- $^{13}\text{C}$  DA FRAÇÃO GEL GHW RESISTENTE À DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH.

Amostra solubilizada em  $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$  ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ), analisada a  $70^\circ\text{C}$ ; deslocamentos químicos expressos em  $\delta$  (ppm).

Analisando o espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (FIGURA 32) observa-se a presença de seis sinais em  $\delta$  102,5; 85,9; 76,2; 72,4; 68,1 e 60,6 ppm, correspondentes aos C1, C3, C5, C2, C4 e C6 das unidades de  $\beta$ -D-Glcp 3-O-substituídas, respectivamente (SANTOS-NEVES *et al.*, 2008b; SMIDERLE *et al.*, 2008a), caracterizando uma cadeia principal linear (1 $\rightarrow$ 3)-ligada. Com um ciclo de degradação controlada de Smith foi possível eliminar as ramificações da fração GHW, demonstrando que a  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-ligada apresenta unidades da cadeia principal substituídas em O-6 apenas por terminais não redutores de  $\beta$ -D-Glcp (RUTHES *et al.*, 2015).

Observando a Figura 29, a fração solúvel em água quente também originou uma  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-ligada. Na fração solúvel foi adicionado etanol para precipitação dos polissacarídeos, seguido de centrifugação e diálise aberta com água corrente em membrana de 2 kDa de limite de exclusão, originando uma fração retida.

A fração retida foi submetida ao processo de congelamento e descongelamento, resultando em uma fração solúvel em água fria (SHWc) e uma fração insolúvel em água fria (PHW).

A fração solúvel em água fria (SHWc), que apresentou composição monossacarídica de 6,3% de galactose e 93,7% de glucose, foi purificada por ultrafiltração em membrana de 100 kDa de limite de exclusão, originando uma fração eluída e uma fração retida (U100R-SHW). Esta fração retida apresentou em sua composição monossacarídica apenas glucose, um perfil de eluição homogêneo quando analisada por HPSEC (FIGURA 33) e massa molar de  $1,4 \times 10^7 \text{ g mol}^{-1}$  ( $dn/dc$  utilizado foi de 0,135).

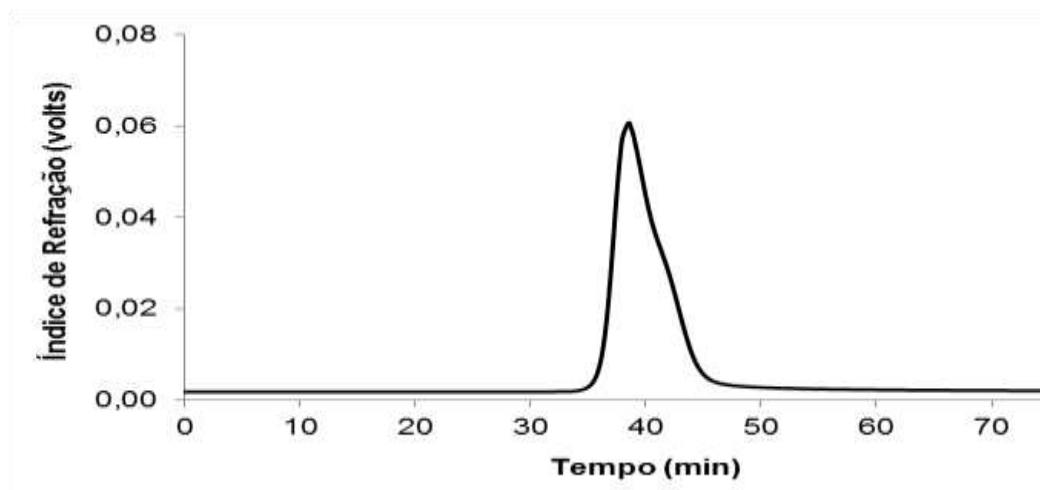


FIGURA 33 – PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC DA FRAÇÃO U100R-SHW DERIVADA DE CORPOS FRUTÍFEROS DE *P. sajor-caju*.

De acordo com a análise de metilação, a fração U100R-SHW apresenta 81,3% unidades de Glcp 3-O-substituída, de acordo com a presença do derivado 2,4,6-Me<sub>3</sub>-Glcp e de 2,2% de unidades de glucose 6-O-substituídas de acordo com a presença do derivado 2,3,4-Me<sub>3</sub>-Glcp. Além disso, U100R-SHW apresenta 8,9% de unidades de glucose 3,6-di-O-substituídas, de acordo com a presença de 2,4-Me<sub>2</sub>-Glcp e 7,6 % de unidades terminais não-redutores, de acordo com a presença do derivado 2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Glcp. Estes dados de metilação sugerem que este polímero é formado por uma

cadeia principal de unidades de Glcp (1→3)-ligadas com poucas cadeias laterais substituídas em O-6 a partir da cadeia principal, sugerindo a presença de uma glucana (1→3),(1→6)-ligada. Desta forma, a glucana U100R-SHW, obtida por extração a quente, é menos ramificada do que GHW, obtida por extração a frio. Além disso, U100R-SHW apresenta algumas unidades de glucose 6-O-substituídas, não observadas em GHW.

Para confirmar a estrutura de U100R-SHW foram realizadas as análises de RMN-<sup>13</sup>C e HSQC. No espectro de RMN-<sup>13</sup>C (FIGURA 34) observaram-se na região anomérica um sinal em  $\delta$  102,7 ppm correspondente à configuração  $\beta$  ( $J_{C-1,H-1} = 160$  Hz) e outro em  $\delta$  99,7 ppm correspondente à configuração  $\alpha$  ( $J_{C-1,H-1} = 170$  Hz) de unidades de Glcp (SASSAKI *et al.*, 2005b). Também foram observados sinais em  $\delta$  86,3, 85,9 e 85,7 ppm de C-3 de unidades 3-O-substituídas e sinal em  $\delta$  67,9 ppm (HSQC – FIGURA 35) de unidades 6-O-substituídas, que são característicos de glucana (1→3),(1→6)-ligada.

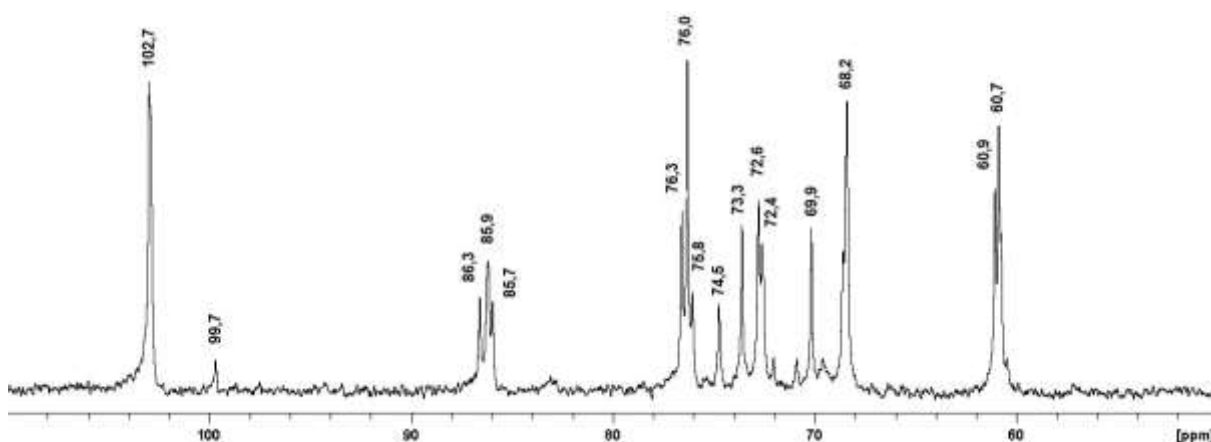


FIGURA 34 - ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C DA FRAÇÃO U100R-SHW, DERIVADA DOS CORPOS FRUTÍFEROS DE *P. sajor-caju*.

Amostra solubilizada em Me<sub>2</sub>SO-*d*<sub>6</sub> (100 mg mL<sup>-1</sup>), analisada a 70 °C; deslocamentos químicos expressos em  $\delta$  (ppm).

Analisando o espectro de HSQC da fração U100R-SHW (FIGURA 35) observam-se sinais na região anomérica em  $\delta$  102,4/ 4,42 ppm correspondente a

C-1/H-1 das unidades de  $\beta$ -D-Glcp 3-O-substituídas e  $\beta$ -D-Glcp 3,6-di-O-substituídas e sinais em  $\delta$  102,5/4,12 ppm correspondentes a C-1/H-1 das unidades de terminais não-redutores de  $\beta$ -D-Glcp. O sinal em  $\delta$  85,7/3,38 ppm refere-se à substituição em O-3 das unidades de  $\beta$ -D-Glcp. Os sinais em  $\delta$  60,5/3,60;3,37 ppm correspondem ao C-6/H-6 das unidades de  $\beta$ -D-Glcp 3-O-substituídas e de terminais não-redutores de  $\beta$ -D-Glcp e os sinais em  $\delta$  67,9/3,96;3,46 ppm são referentes ao C-6/H-6 das unidades de  $\beta$ -D-Glcp 3,6-di-O-substituídas.

O sinal observado em  $\delta$  99,7 ppm no espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (FIGURA 34) desta fração não foi observado no espectro de HSQC (FIGURA 35).

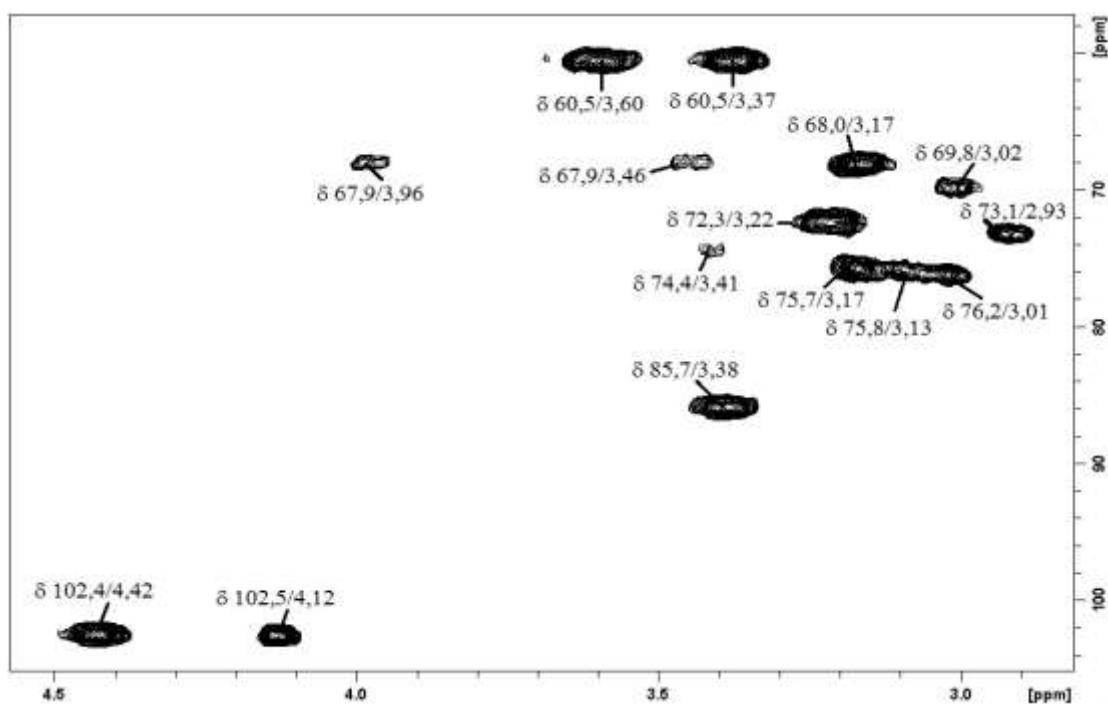


FIGURA 35 - ESPECTRO DE HSQC DA FRAÇÃO U100R-SHW, DERIVADA DOS CORPOS FRUTÍFEROS DE *P. sajor-caju*.

Amostra solubilizada em  $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$  ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ), analisada a  $70^\circ\text{C}$ ; deslocamentos químicos expressos em  $\delta$  (ppm).

A Tabela 6 traz os assinalamentos químicos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da fração U100R-SHW elaborada a partir do espectro de HSQC (FIGURA 35).

TABELA 6 – ASSINALAMENTOS DE  $^1\text{H}$  E  $^{13}\text{C}$  DA FRAÇÃO U100R-SHW ISOLADA DOS CORPOS FRUTÍFEROS DE *P. sajor-caju*.

Resíduos <sup>a</sup>	Deslocamentos químicos (ppm)					
	C-1 H-1	C-2 H-2	C-3 H-3	C-4 H-4	C-5 H-5	C-6 H-6
→3)-β-D-Glcp-(1→	102,4	72,3	85,7	68,0	75,7	60,5
	4,42	3,22	3,38	3,17	3,17	3,60 e 3,37
→3,6)-β-D-Glcp-(1→	102,4	72,3	85,7	68,0	74,4	67,9
	4,42	3,22	3,38	3,17	3,41	3,96 e 3,46
β-D-Glcp-(1→	102,5	73,1	76,2	69,8	75,8	60,5
	4,12	2,93	3,01	3,02	3,13	3,60 e 3,37

<sup>a</sup> Assinalamentos com base no espectro de HSQC.

Esta fração passou por dois ciclos do processo de degradação controlada de Smith (FIGURA 36), para evidenciar o tipo de ligação da cadeia principal.

Analisando o espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (FIGURA 36A) da fração U100R-SHW resistente à um ciclo de degradação controlada de Smith, observa-se a presença de seis sinais principais em  $\delta$  102,9; 86,1; 76,3; 72,8; 68,4 e 60,9 ppm, correspondentes aos C1, C3, C5, C2, C4 e C6, de unidades de β-D-Glcp 3-O-substituídas, respectivamente. Este resultado demonstra que a cadeia principal da fração U100R-SHW é formada por unidades de β-D-Glcp 3-O-substituídas.

A realização de dois ciclos de degradação controlada de Smith (FIGURA 36B) não promoveu mudanças na estrutura da fração U100R-SHW resistente à um ciclo de degradação controlada de Smith, permanecendo seis sinais de menor intensidade (FIGURA 36A e B), observados em  $\delta$  99,7, 82,9, 71,9, 70,9, 69,5 e 60,3 ppm. Uma fração solúvel em água quente seguida de tratamento por solução de Fehling (MRFS-HW) após três ciclos de degradação controlada de Smith apresentou sinais em  $\delta$  99,6, 83,0, 72,1, 70,9, 69,7 e 60,7 ppm correspondentes a C1, C3, C5, C2, C4 e C6, respectivamente, de um polímero linear de α-D-glucana (1→3)-ligada (SANTOS-NEVES *et al.*, 2008a). Os sinais de menor intensidade da fração U100R-SHW são semelhantes aos observados por Santos-Neves *et al.* (2008a), indicando a presença de um polímero contendo unidades de α-D-glucose (1→3)-ligadas.



Portanto, com os resultados de metilação associados aos de RMN- $^{13}\text{C}$  e HSQC, pode-se propor que a fração U100R-SHW é uma  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-ligada, com presença de uma  $\alpha$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3)-ligada.

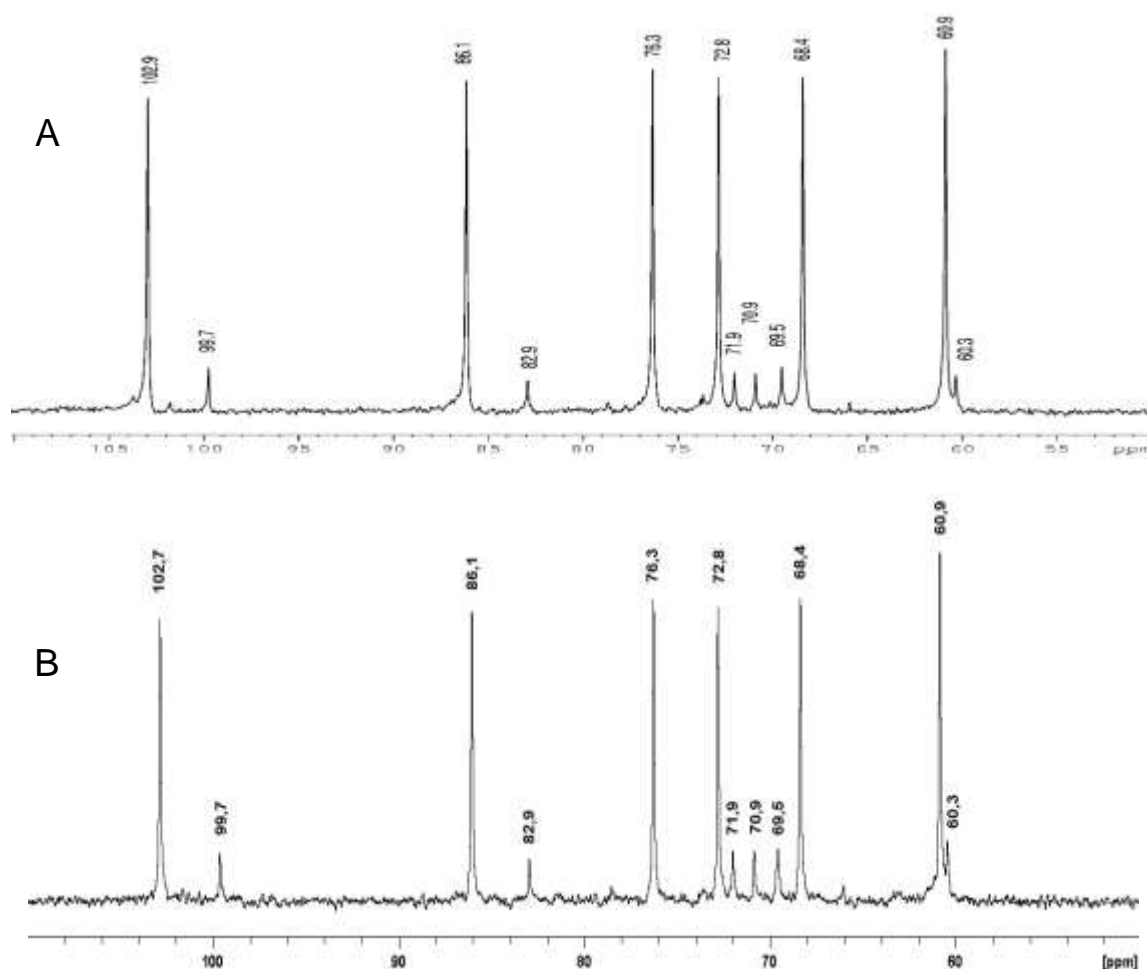


FIGURA 36 – ESPECTRO DE RMN- $^{13}\text{C}$  DA FRAÇÃO U100R-SHW RESISTENTE A UM CICLO (A) E DOIS CICLOS (B) DE DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH.

Amostra solubilizada em  $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$  (100 mg  $\text{mL}^{-1}$ ), analisada a 70  $^{\circ}\text{C}$ ; deslocamentos químicos expressos em  $\delta$  (ppm).

Neste trabalho também foi obtida uma  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-ligada partindo da fração alcalina (HA) (FIGURA 37) dos corpos frutíferos. A fração alcalina (HA) foi neutralizada e dialisada em membrana de 6-8 kDa de limite de exclusão, originando uma fração retida, que passou pelo processo de congelamento e descongelamento, promovendo a separação da fração solúvel em água fria (SHA).

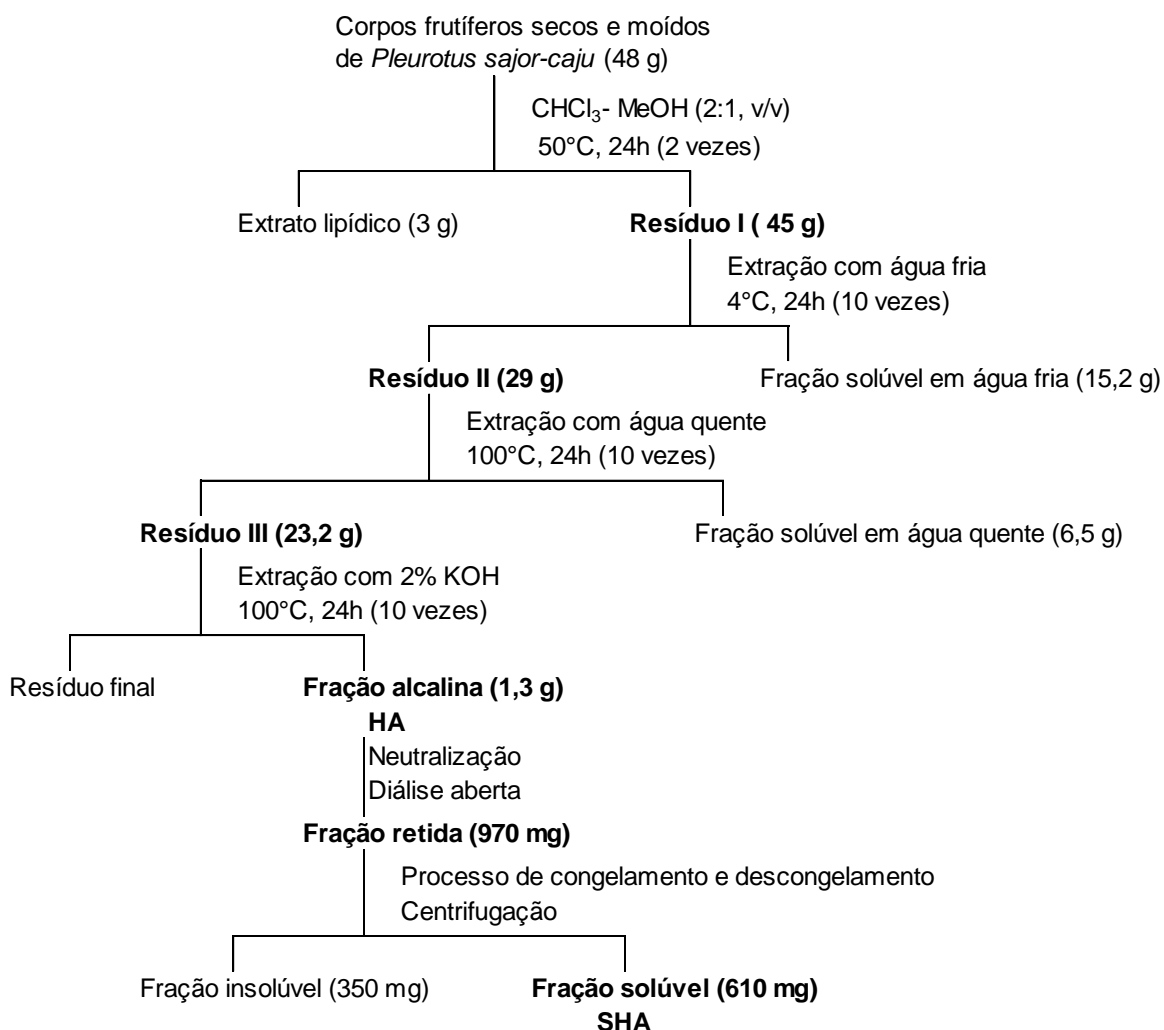


FIGURA 37 – FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA GLUCANA PRESENTE NO EXTRATO ALCALINO DOS CORPOS FRUTÍFEROS DE *P. sajor-caju*.

A fração SHA apresentou apenas glucose em sua composição monossacarídica e um espectro de HSQC com sinais característicos de uma  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-ligada (FIGURA 38). Este espectro de HSQC foi muito semelhante aos obtidos para as  $\beta$ -D-glucanas (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-ligadas isoladas a partir do extrato aquoso quente de corpos frutíferos e da biomassa micelial.

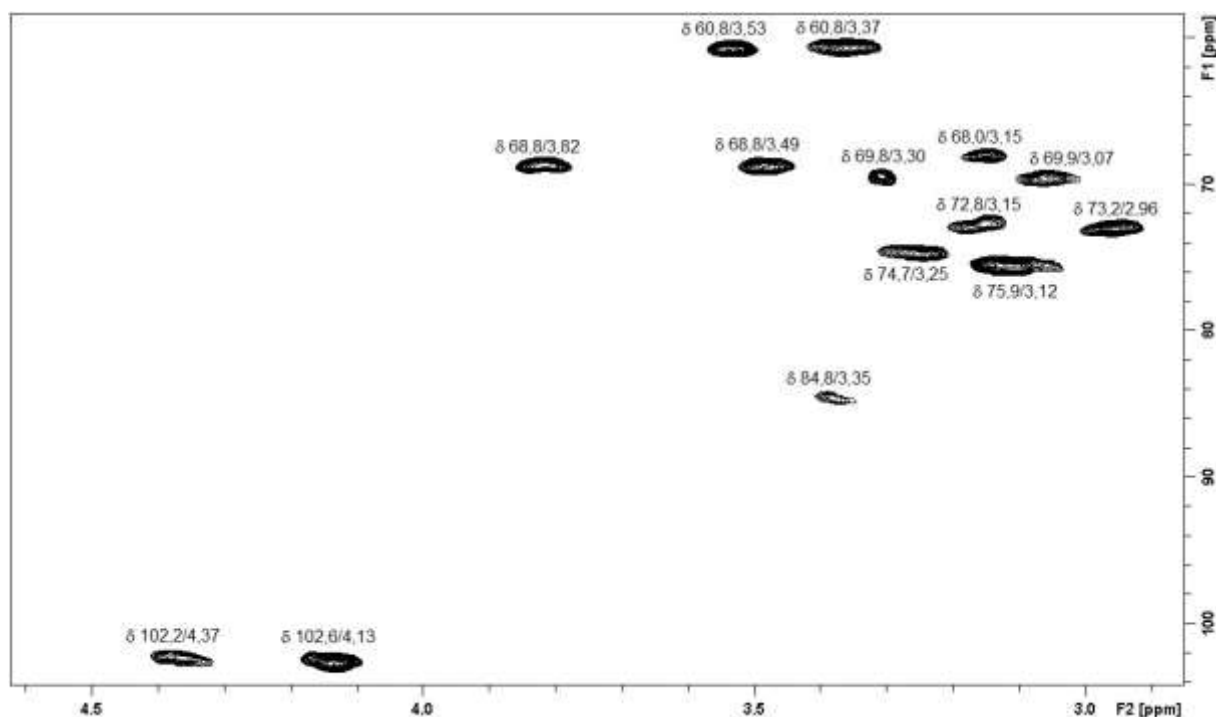


FIGURA 38 - ESPECTRO DE HSQC DA FRAÇÃO SHA, DERIVADA DOS CORPOS FRUTÍFEROS DE *P. sajor-caju*.

Amostra solubilizada em D<sub>2</sub>O (100 mg mL<sup>-1</sup>), analisada a 50 °C; deslocamentos químicos expressos em  $\delta$  (ppm).

Estruturas de  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-ligadas derivadas de corpos frutíferos do gênero *Pleurotus* já foram relatadas na literatura e apresentaram sinais de RMN semelhantes aos obtidos para as estruturas purificadas neste trabalho.

Estruturas de  $\beta$ -D-glucanas, com cadeia principal formada por unidades de  $\beta$ -D-Glcp 3-O-substituídas com unidades de  $\beta$ -D-Glcp substituídas em O-6, foram isoladas da fração insolúvel do extrato alcalino dos corpos frutíferos de *P. ostreatus* (pleuran) (KARÁCSONYI e KUNIAK, 1994), de *P. tuber-regium* (ZHANG *et al.*, 2001) e de *P. florida* (SANTOS-NEVES *et al.*, 2008b), da fração solúvel do extrato alcalino de corpos frutíferos de *P. tuber-regium* (GHENGHUA *et al.*, 2000) e da fração insolúvel em água fria, obtida a partir do extrato aquoso quente de corpos frutíferos de *P. eryngii* e *P. ostreatoroseus* (CARBONERO *et al.*, 2006). A mesma estrutura foi também relatada por Synytsya *et al.* (2009) obtida da fração solúvel do extrato aquosos e da fração insolúvel do extrato alcalino de corpos frutíferos de *P. ostreatus* e *P. eryngii* e por Carbonero *et al.* (2012) obtida da fração gel do extrato aquoso quente de corpos

frutíferos de *P. sajor-caju*. De *P. tuber-regium* também foram isoladas glucanas a partir da fração solúvel em água, obtida a partir do extrato alcalino que apresentaram cadeia principal formada por unidades de  $\beta$ -D-Glcp 4-O-substituídas e 3-O-substituídas com ramificações em O-6 e O-3 (CHEN *et al.*, 2014a,b; CHEN e CHEUNG, 2014).

Os trabalhos relatados que evidenciaram a presença de  $\beta$ -D-glucanas (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-ligadas isoladas de corpos frutíferos do gênero *Pleurotus*, utilizaram corpos frutíferos que foram cultivados em fazendas sem informar o substrato utilizado para o cultivo. Neste trabalho, os corpos frutíferos foram cultivados em substrato composto por folhas de bananeira e foi possível observar a presença da  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-ligada. Para os cogumelos deste gênero, cultivados em locais diferentes e, possivelmente, com substratos diferentes, foi observada a presença de estruturas polissacarídicas semelhantes, sugerindo que o substrato não influencia na formação desta estrutura. Assim, cogumelos do gênero *Pleurotus* produzem a  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-ligada, independente do substrato no qual são cultivados, pois, segundo relato de literatura, esta glucana é componente estrutural da parede celular do corpo frutífero (CHEN e SERVIOUR, 2007; CHEN e CHEUNG, 2014).

A partir da biomassa micelial também foi obtida uma  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-ligada, sendo o fluxograma de purificação mostrado na Figura 39.

Partindo do resíduo II, obtido após a extração aquosa a frio, a fração solúvel em água quente (HW) foi precipitada com etanol, dialisada em água corrente em membrana de 2 kDa de limite de exclusão, originando uma fração retida (FIGURA 39). A fração retida foi submetida ao processo de congelamento e descongelamento, resultando em uma fração solúvel em água fria (SHWb) e uma fração insolúvel em água fria (IHW).



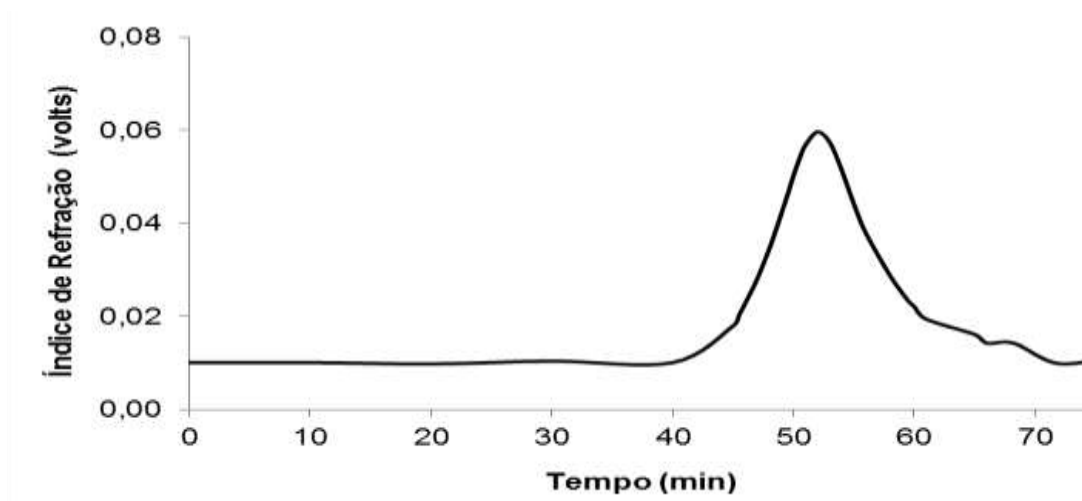


FIGURA 40 – PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC DA FRAÇÃO U3SHW, DERIVADA DE BIOMASSA MICELIAL DE *P. sajor-caju*.

A fim de purificar a fração U3SHW foi realizado um processo de congelamento e descongelamento, que resultou em uma fração insolúvel e uma fração solúvel em água fria. A fração solúvel em água fria foi analisada por RMN- $^{13}\text{C}$  e o espectro (FIGURA 41) demonstrou sinais em  $\delta$  102,4 ppm correspondente à C1, sinais em  $\delta$  85,7, 85,6 e 85,5 ppm correspondentes à substituição em O-3 e sinal em  $\delta$  68,0 ppm (HSQC - FIGURA 43) correspondentes à substituição em O-6. Estes sinais são característicos de unidades de  $\beta$ -D-Glcp 3-O-substituídas. Porém, o espectro de U3SHW ainda apresenta pequenos picos de componentes que, provavelmente, não fazem parte do polímero principal.

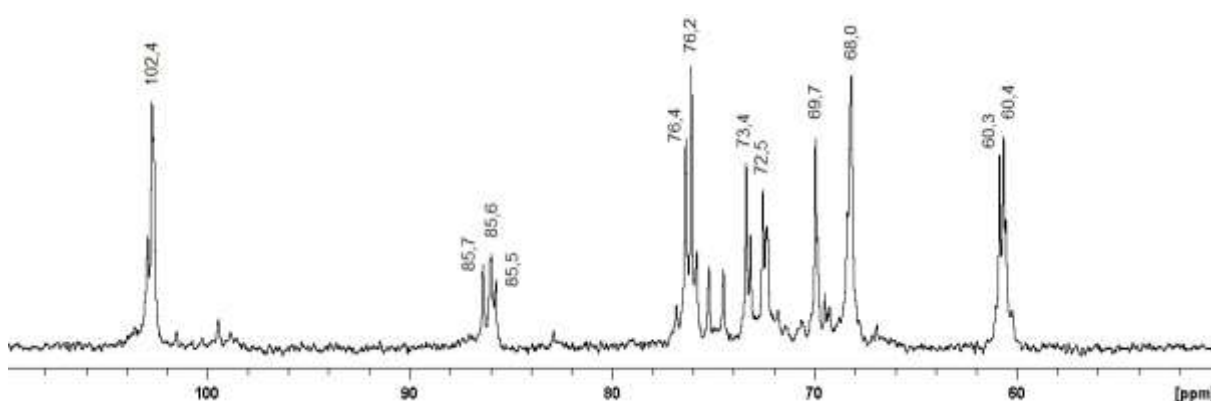


FIGURA 41 - ESPECTRO DE RMN- $^{13}\text{C}$  DA FRAÇÃO U3SHW, DERIVADA DA BIOMASSA MICELIAL DE *P. sajor-caju*.

Amostra solubilizada em  $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$  ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ), analisada a  $70^\circ\text{C}$ ; deslocamentos químicos expressos em  $\delta$  (ppm).

Esta fração solúvel (U3SHW) foi então, submetida à extração com dimetilsulfóxido a quente, originando uma fração solúvel em dimetilsulfóxido (M-U3SHW), que apresentou apenas glucose em sua composição monossacarídica, um perfil de eluição homogêneo quando analisada por HPSEC (FIGURA 42) e valor de massa molar de  $6,4 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$  ( $dn/dc$  utilizado foi de 0,135).

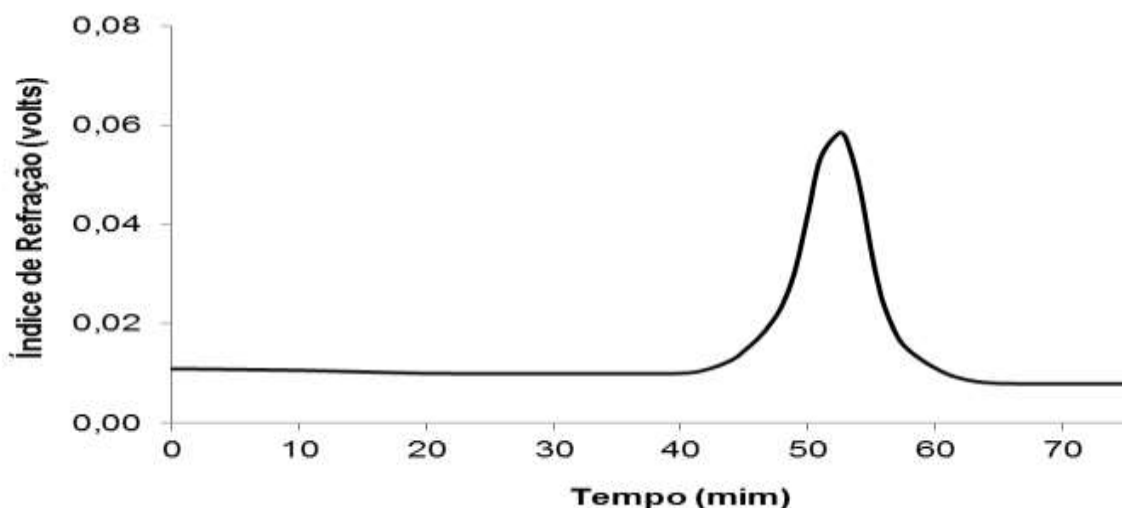


FIGURA 42 – PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC DA FRAÇÃO M-U3SHW, DERIVADA DE BIOMASSA MICELIAL DE *P. sajor-caju*.

Quando analisada por HSQC (FIGURA 43) a fração M-U3SHW apresentou sinais em  $\delta$  102,4/4,43 ppm, na região anomérica, para as unidades de  $\beta$ -D-Glcp 3-O-substituídas e 3,6-di-O-substituídas, assim como um sinal em  $\delta$  85,6/3,38 ppm correspondente ao C-3/H-3, sinais em  $\delta$  72,0/3,21 ppm correspondentes ao C-2/H-2 e sinais em  $\delta$  67,9/3,17 ppm correspondentes ao C-4/H-4. As unidades terminais não-redutoras apresentaram sinais em  $\delta$  102,5/4,12, 73,4/2,94, 76,2/3,02, 69,7/3,02 e 76,0/3,08 ppm correspondentes aos C-1/H-1, C-2/H-2, C-3/H-3, C-4/H-4 e C-5/H-5, respectivamente. As unidades  $\beta$ -D-Glcp 3,6-di-O-substituídas apresentaram sinais de C-6/H-6 em  $\delta$  68,0/3,91;3,51 ppm, enquanto as unidades de  $\beta$ -D-Glcp 3-O-substituídas e os terminais não-redutores de  $\beta$ -D-Glcp apresentaram sinais de C-6/H-6 em  $\delta$  60,4/3,61;3,37 ppm. Estes resultados indicam que M-U3SHW é composto por uma  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)-ligada, similar a outras já relatadas na literatura

(CARBONERO *et al.*, 2006; SANTOS-NEVES *et al.*, 2008b; SMIDERLE *et al.*, 2008a; CARBONERO *et al.*, 2012).

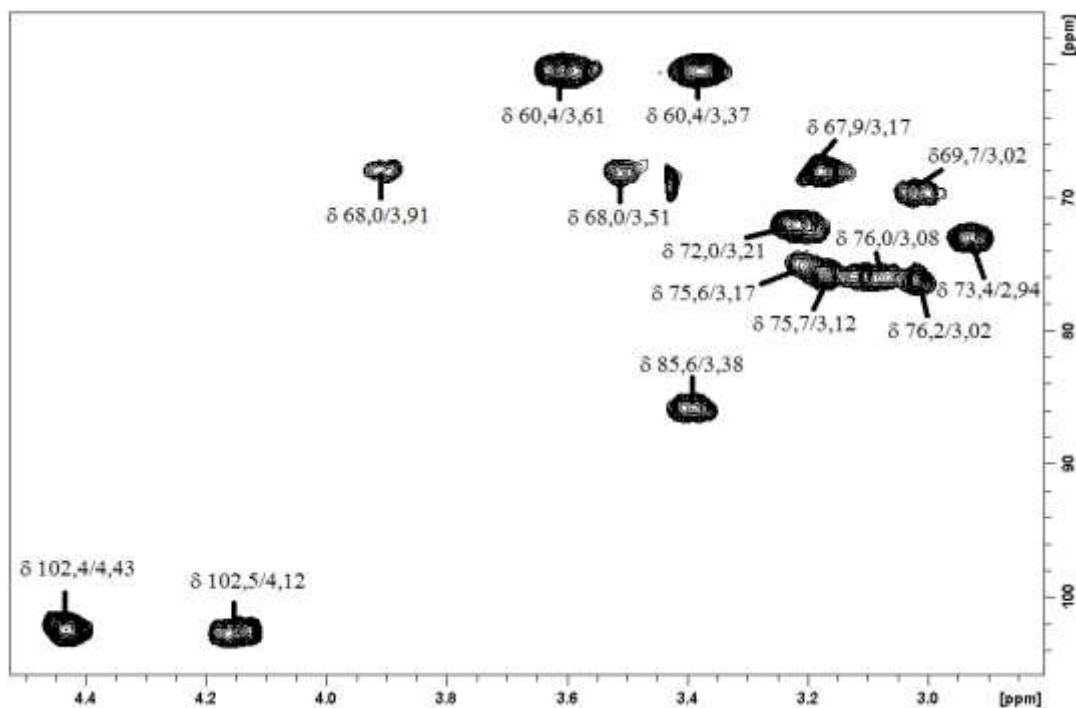


FIGURA 43- ESPECTRO DE HSQC DA FRAÇÃO M-U3SHW, DERIVADA DA BIOMASSA MICELIAL DE *P. sajor-caju*.

Amostra solubilizada em  $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$  ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ), analisada a  $70^\circ \text{C}$ ; deslocamentos químicos expressos em  $\delta$  (ppm).

Na Tabela 7 estão agrupados os resultados dos derivados parcialmente metilados das frações GHW, U100R-SHW e M-U3SHW, obtidas dos corpos frutíferos e da biomassa micelial de *P. sajor-caju*, respectivamente.

As três  $\beta$ -D-glucanas (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-ligadas caracterizadas demonstraram diferenças em relação a quantidade de ramificação, sendo a GHW a estrutura mais ramificada, em função da presença de 32,0% do derivado 2,4-Me<sub>2</sub>-Glc<sub>p</sub>, quando comparado a 8,9% e 19,7% deste mesmo derivado para U100R-SHW e M-U3SHW, respectivamente. Estas ramificações são comprovadas pela presença de terminais não-redutores em quantidades similares a quantidade de unidades de Glc<sub>p</sub> 3,6-di-O-substituídas.



TABELA 7 - RESULTADOS DOS DERIVADOS PARCIALMENTE METILADOS DAS FRAÇÕES GHW E U100R-SHW DE CORPOS FRUTÍFEROS e M-U3SHW DA BIOMASSA MICELIAL DE *P. sajor-caju*.

Derivados parcialmente metilados	GHW	U100R-SHW	M-U3SHW
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Glc <sub>p</sub>	32,9 %	7,6 %	16,5 %
2,4,6-Me <sub>3</sub> -Glc <sub>p</sub>	35,1 %	81,3 %	61,3 %
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Glc <sub>p</sub>	-	2,2 %	2,5 %
2,4-Me <sub>2</sub> -Glc <sub>p</sub>	32,0 %	8,9 %	19,7 %

Neste trabalho quatro polímeros foram caracterizados como  $\beta$ -D-glucanas (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-ligadas, três derivadas de corpos frutíferos (GHW, U100R-SHW e SHA) e uma derivada de biomassa micelial (M-U3SHW), demonstrando que o cultivo líquido pode ser utilizado para a obtenção deste polímero partindo de biomassa micelial.

#### 6.2.2.2 Glucana (1 $\rightarrow$ 3)-ligada

Outro polímero formado por unidades de glucose foi extraído e caracterizado neste trabalho, partindo tanto a partir dos corpos frutíferos quanto da biomassa micelial.

O resíduo II do corpo frutífero (FIGURA 29) foi submetido à extração aquosa a quente e, a partir deste extrato, foi obtida uma fração insolúvel após processo de congelamento e descongelamento, denominada PHW (FIGURA 29). Esta fração apresentou como monossacarídeos majoritários manose (15,2 %) e glucose (75,1 %). Com objetivo de purificar esta fração, foi realizada uma extração com dimetilsulfóxido, obtendo-se uma fração solúvel. Esta fração solúvel (M-PHW) foi dialisada em membrana de 6-8 kDa de limite de exclusão, contra água corrente, e a amostra retida na membrana foi submetida ao processo de congelamento e descongelamento. A fração insolúvel em água fria (G-PHW) apresentou 98% de glucose em sua composição. Este processo já foi utilizado para purificar  $\beta$ -D-glucanas (1 $\rightarrow$ 6)-ligadas

isoladas de *Agaricus bisporus* e *Agaricus brasiliensis* (SMIDERLE *et al.*, 2013). O esquema de purificação de G-PHW é apresentado na Figura 29.

A análise de metilação para G-PHW indicou a presença de 2,4,6-Me<sub>3</sub>-Glc<sub>p</sub> (99,9%) e 2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Glc<sub>p</sub> (0,1%), relativas a uma estrutura linear de glucana (1→3)-ligada. As frações PHW, M-PHW e G-PHW foram analisadas por RMN-<sup>13</sup>C e os espectros relativos a estas análises estão apresentados na Figura 44.

Observando os espectros apresentados na Figura 44, percebe-se a redução dos sinais de menor intensidade presentes na Figura 44A quando comparada a Figura 44B e 44C sendo que, nesta última, há presença de seis sinais principais, típicos das β-D-glucanas lineares.

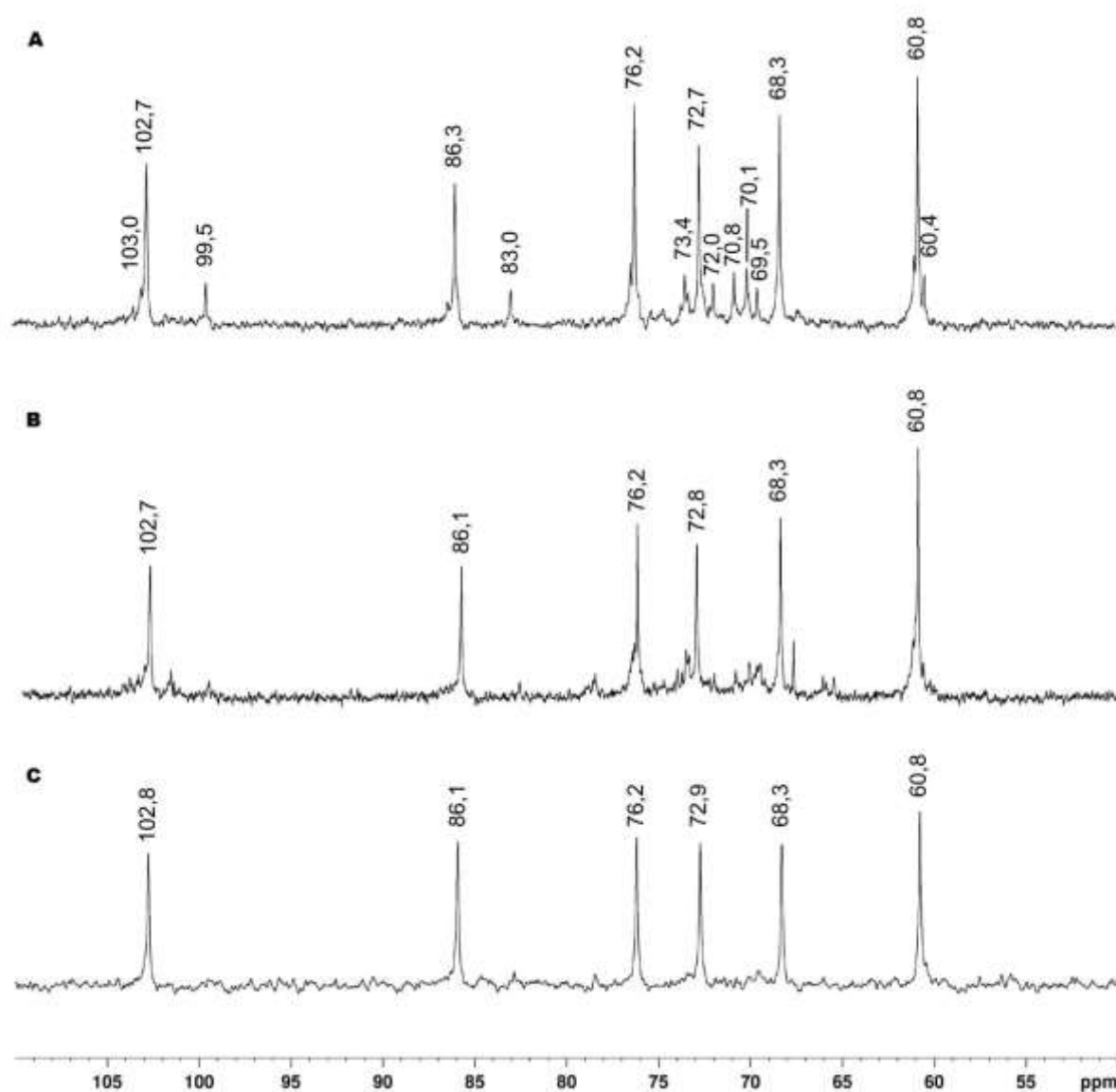


FIGURA 44 – ACOMPANHAMENTO DE PURIFICAÇÃO PELOS ESPECTROS DE RMN- $^{13}\text{C}$  DAS FRAÇÕES CONTENDO  $\beta$ -D-GLUCANA, DERIVADAS DOS CORPOS FRUTÍFEROS DE *P. sajor-caju*. (A) PHW, (B) M-PHW E (C) G-PHW ( $\beta$ -D-GLUCANA PURIFICADA).

A amostra PHW foi solubilizada em  $\text{D}_2\text{O}$  ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ) e as amostras M-PHW e G-PHW foram solubilizadas em  $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$  ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Todas foram analisadas a  $70^\circ\text{C}$ ; deslocamentos químicos expressos em  $\delta$  (ppm).

Para evidenciar os sinais desta fração (G-PHW) foi realizada análise de HSQC (FIGURA 45), onde se observa a presença de sinais em  $\delta$  102,8/4,41; 86,1/3,37;

76,2/3,13; 72,9/3,18; 68,3/3,12 e 60,8/3,59;3,34 ppm correspondentes ao C-1/H-1, C-3/H-3, C-5/H-5, C-2/H-2, C-4/H-4 e C-6/H-6, respectivamente. Esta análise confirma a presença da  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3)-ligada, uma glucana linear ainda não observada em cogumelos do gênero *Pleurotus*.

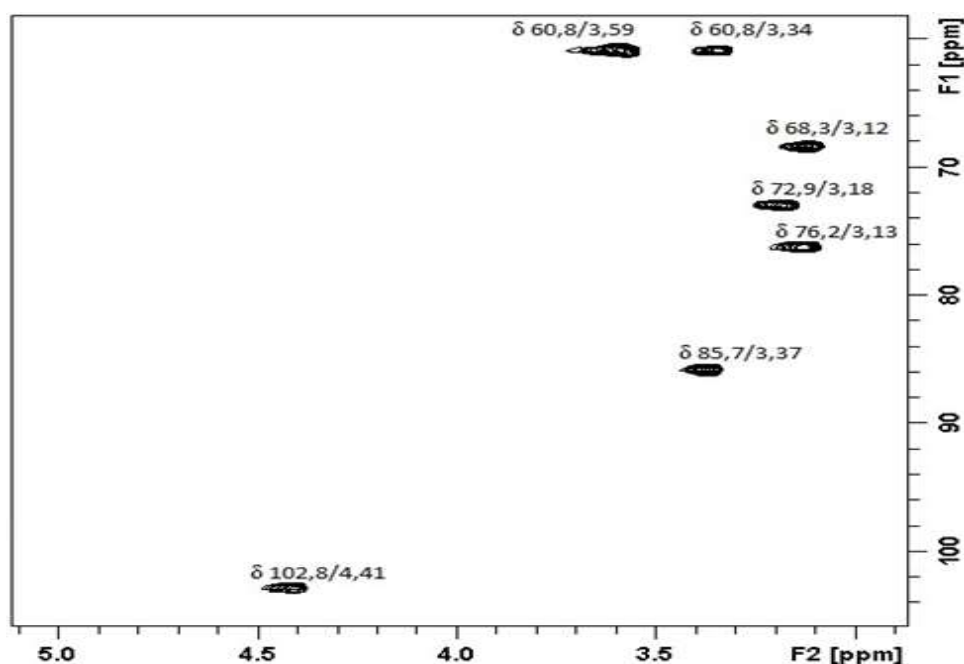


FIGURA 45 - ESPECTRO DE HSQC DA  $\beta$ -D-GLUCANA (G-PHW), DERIVADA DOS CORPOS FRUTÍFEROS DE *P. sajor-caju*.

Amostra G-PHW foi solubilizada em  $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$  (100 mg  $\text{mL}^{-1}$ ), analisada a 70 °C; deslocamentos químicos expressos em  $\delta$  (ppm).

$\beta$ -D-glucanas lineares (1 $\rightarrow$ 3)-ligadas foram isoladas da fração insolúvel em água do basidioma de *Poria cocos* (HOFFMANN *et al.*, 1971), da fração solúvel em uma solução de 0,5 M NaOH/0,2 M uréia do mesmo cogumelo (CHEN *et al.*, 2009), de extrato alcalino a quente do corpo frutífero de *Termitomyces eurhizus* (CHAKRABORTY *et al.*, 2006) e da fração insolúvel em água do corpo frutífero de *Ganoderma lucidum* após a extração com solução aquosa de NaOH (WANG e ZHANG, 2009).

Foi também isolada uma estrutura linear  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 6)-ligada obtida da fração insolúvel em água do extrato alcalino de corpos frutíferos de *P. florida* var. blue, com massa molar de  $2,02 \times 10^5$  g mol<sup>-1</sup> e sinais em  $\delta$  103,4/4,51, 75,9/3,48, 75,3/3,61, 73,4/3,31, 69,9/3,46 e 69,2/3,84;4,19 ppm correspondentes aos C-1/H-1, C-3/H-3, C-5/H-5, C-2/H-2, C-4/H-4 e C-6/H-6, respectivamente (DEY *et al.*, 2012).

Também foram obtidas estruturas lineares de  $\alpha$ -D-glucanas para o gênero *Pleurotus*. A partir de corpos frutíferos de *P. ostreatus* e *P. eryngii* foram obtidas frações solúveis em água do extrato alcalino (L2) onde foram observadas a presença de  $\alpha$ -D-glucanas (1 $\rightarrow$ 3)-ligadas para as duas linhagens, com sinais em  $\delta$  100,9, 84,5, 71,5, 60,5 ppm correspondentes ao C-1, C-3, C-2 e C-6, respectivamente (SYNYTSYA *et al.*, 2009). Do extrato aquoso quente de corpos frutíferos de *P. ostreatus* foi isolado uma  $\alpha$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 4)-ligada, confirmada pela presença de 2,3,6-Me<sub>3</sub>-Glc<sub>p</sub> como único derivado parcialmente metilado e de sinais em  $\delta$  5,35, 3,92, 3,83, 3,81, 3,61 e 3,38 ppm correspondentes ao H-1, H-3, H-5, H-6, H-4 e H-2, respectivamente (PALACIOS *et al.*, 2012).

Uma  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3)-ligada também foi obtida da fração insolúvel em água fria (IHW) do extrato aquoso quente da biomassa micelial de *P. sajor-caju* (FIGURA 37). Seu espectro de RMN-<sup>13</sup>C (FIGURA 46) apresentou seis sinais principais em  $\delta$  101,9; 85,2; 75,4; 71,9; 67,5 e 60,0 ppm correspondentes aos C-1, C-3, C-5, C-2, C-4 e C-6, respectivamente. Uma vez que no espectro de RMN-<sup>13</sup>C da fração IHW apareceram alguns sinais de baixa intensidade, sugerindo que a fração ainda não estava purificada, um novo processo de congelamento e descongelamento foi realizado.

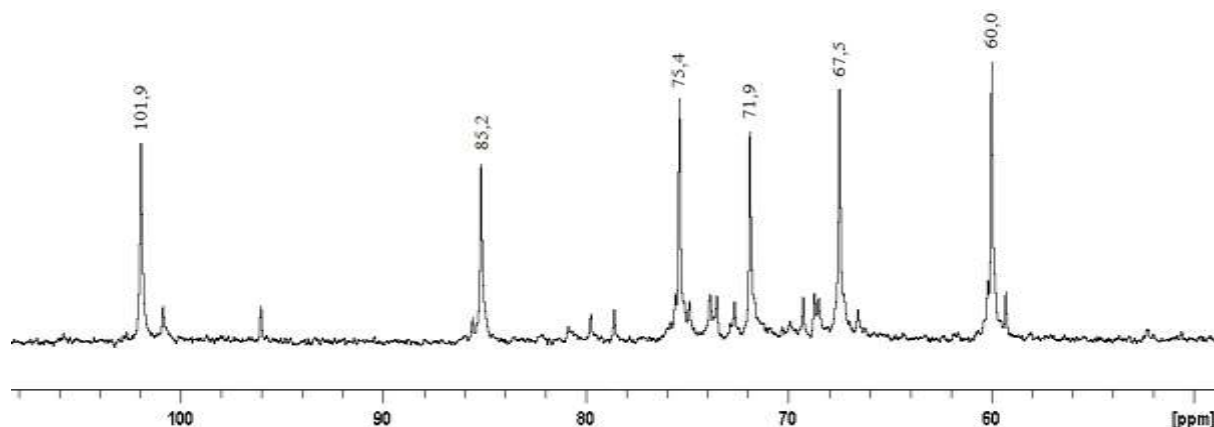


FIGURA 46 – ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C DA β-D-GLUCANA (M-IHW), DERIVADA DA BIOMASSA MICELIAL DE *P. sajor-caju*.

Amostra foi solubilizada em Me<sub>2</sub>SO-*d*<sub>6</sub> (100 mg mL<sup>-1</sup>), analisada a 70 °C; deslocamentos químicos expressos em δ (ppm).

A análise de HSQC (FIGURA 47) da fração insolúvel em água fria (IM-IHW) demonstrou que este processo foi eficiente para a purificação, pois apresentou apenas seis sinais, que estão presentes em δ 101,9/4,38 (C-1/H-1), 71,9/3,15 (C-2/H-2) 85,2/3,34 (C-3/H-3) 67,5/3,11 (C-4/H-4) 75,4/3,11 (C-5/H-5) e 60,0/3,56;3,31 ppm (C-6/H-6).

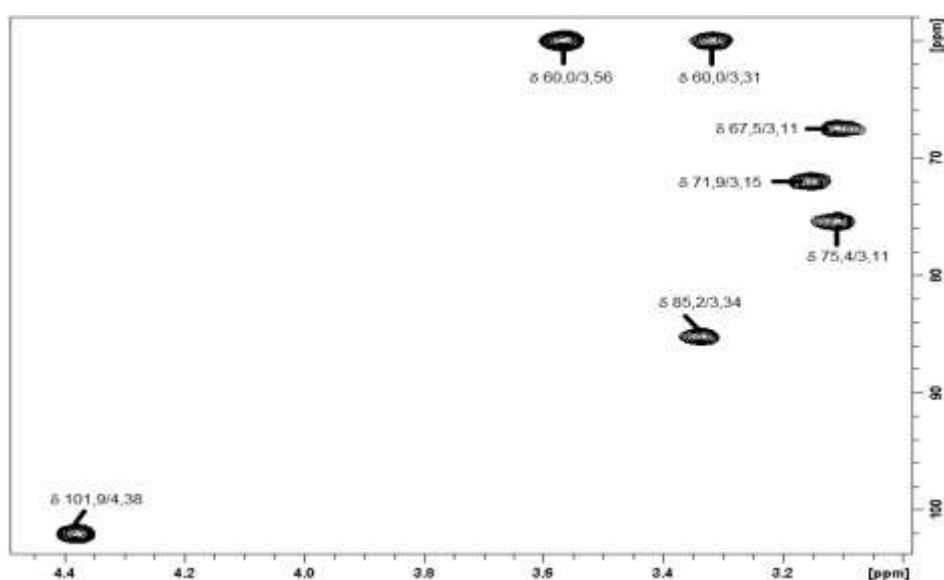


FIGURA 47 - ESPECTRO DE HSQC DA β-D-GLUCANA (IM-IHW), DERIVADA DA BIOMASSA MICELIAL DE *P. sajor-caju*.

Amostra foi solubilizada em Me<sub>2</sub>SO-*d*<sub>6</sub> (100 mg mL<sup>-1</sup>), analisada a 70 °C; deslocamentos químicos expressos em δ (ppm).

Os sinais observados para a fração IM-IHW (FIGURA 47) são semelhantes aos obtidos para a  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3)-ligada denominada G-PHW (FIGURA 45), derivada dos corpos frutíferos. Assim, verificou-se que este polímero pode ser obtido tanto de corpos frutíferos quanto de biomassa micelial, sendo esta última obtida por um processo mais controlado (cultivo líquido) do que o processo de produção de corpos frutíferos (cultivo sólido).

O Quadro 1 apresenta os polissacarídeos extraídos e caracterizados dos corpos frutíferos, da biomassa micelial e do caldo de cultivo de *P. sajor-caju* por este trabalho.

QUADRO 1 – POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS E CARACTERIZADOS DOS CORPOS FRUTÍFEROS, DA BIOMASSA MICELIAL E DO CALDO DE CULTIVO DE *P. sajor-caju*.

Corpos frutíferos	Biomassa micelial	Caldo de cultivo
Manogalactana	Manogalactana	Manogalactana
$\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-ligada	$\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-ligada	-
$\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3)-ligada	$\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3)-ligada	-

Conforme apresentado no Quadro 1, este trabalho isolou três polissacarídeos dos corpos frutíferos (manogalactana,  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-ligada e  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3)-ligada) e demonstrou que estes mesmos polímeros estão presentes na biomassa micelial, sendo um destes três polímeros uma  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3)-ligada, que não havia sido relatada para fungos deste gênero. Também obteve-se uma manogalactana com maior porcentagem de unidades de galactoses metiladas quando o material utilizado para a extração foi o caldo de cultivo. Ainda, foi possível propor a presença de uma estrutura de  $\alpha$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3)-ligada presente associada a  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-ligada (U100R-SHW) de corpos frutíferos de *P. sajor-caju*.

Portanto, estes resultados comprovam que o cultivo líquido pode ser utilizado como forma de produção para a obtenção dos mesmos polissacarídeos presentes nos corpos frutíferos produzidos pelo método tradicional (cultivo sólido).

### 6.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS POLISSACARÍDEOS CARACTERIZADOS ESTRUTURALMENTE

Neste trabalho foram avaliadas as atividades antinociceptivas e anti-inflamatórias de três polissacarídeos.

A manogalactana (PEIsR) obtida do caldo de cultivo, escolhida por apresentar uma quantidade maior de galactose metiladas naturalmente em relação as manogalactanas isoladas de corpos frutíferos e biomassa micelial.

A  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-ligada (GHW) obtida do corpos frutíferos, escolhida por apresentar uma quantidade maior de unidades de glucose 3,6-di-O-substituídas, ou seja, uma maior quantidade de ramificações em relação a mesma estrutura isolada da biomassa micelial.

A  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3)-ligada (G-PHW) derivada de corpos frutíferos, em função do rendimento obtido.

#### 6.3.1 Manogalactana

A atividade antinociceptiva da manogalactana isolada do caldo de cultivo (PEIsR), com massa molecular de  $6,4 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$ , foi avaliada usando o teste de contorção abdominal em camundongos (FIGURA 48). Este modelo avalia manifestações de nocicepção e de resposta reflexas induzida por injeção intraperitoneal de ácido acético, que sensibiliza os nociceptores locais e causa a sensação de dor, que pode ser observada nos animais por suas respostas comportamentais (KOSTER *et al.*, 1959).



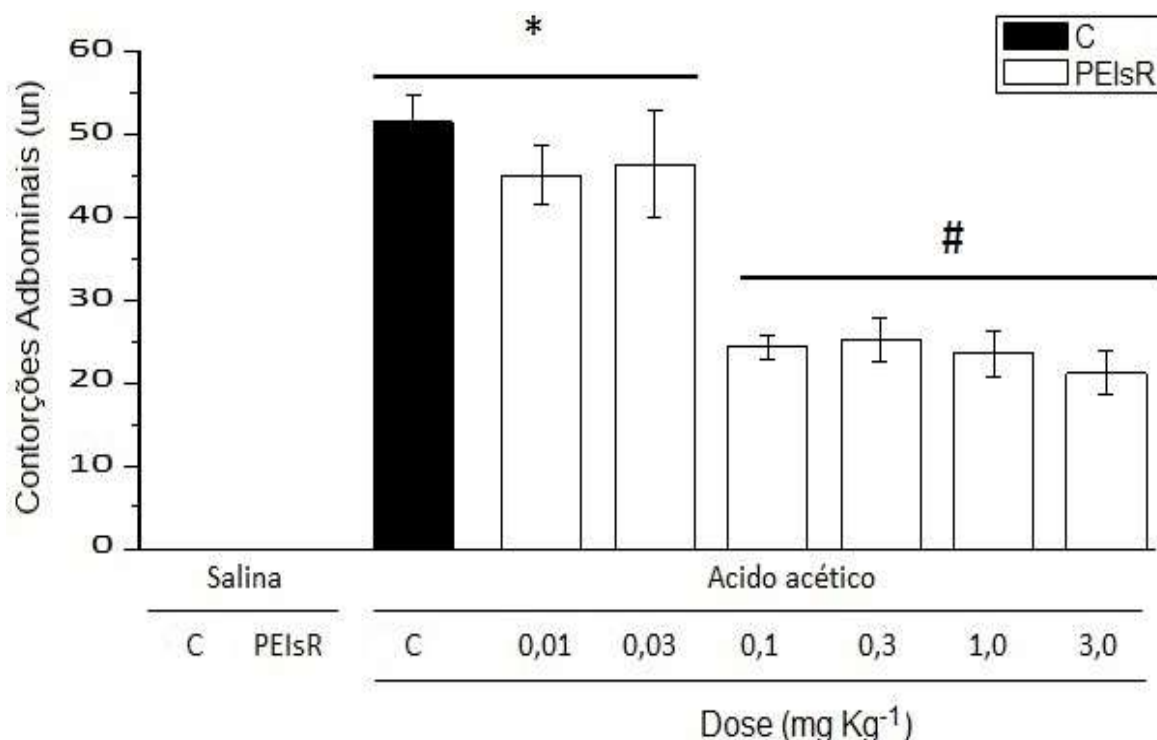


FIGURA 48 – EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DA MANOGALACTANA (PEIsR) DERIVADA DO CALDO DE CULTIVO DE *P. sajor-caju* SOBRE O NÚMERO DE CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS POR ÁCIDO ACÉTICO EM CAMUNDONGOS.

Os resultados representam os valores médios  $\pm$  desvio padrão ( $n = 8$ ). Legenda: grupo salina tratado com manogalactana (salina PEIsR: 3,0 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.), grupo controle não tratado (C: solução carboximetilcelulose 0,5 %, 10 mL kg<sup>-1</sup>, i.p.), grupo tratado com manogalactana (PEIsR: 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1,0 e 3,0 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.), 30 minutos antes da administração de ácido acético.

\* Indica a existência de diferença significativa entre o grupo tratado com manogalactana e o grupo controle não tratado C,  $p < 0,05$ .

Os camundongos tratados com as doses de 0,1, 0,3, 1,0 e 3,0 mg kg<sup>-1</sup> de manogalactana (PEIsR) apresentaram diminuição estatisticamente significativa no número de contorções induzidas por ácido acético quando comparadas com o grupo controle não tratado (FIGURA 48). No entanto, estas doses não apresentaram diferenças significativas entre si e apresentaram uma redução média de 54% no número de contorções. Mesmo não sendo um efeito dose dependente, a manogalactana apresentou uma marcante atividade antinociceptiva.

Para verificar se a manogalactana pode causar nocicepção, a dose 3 mg kg<sup>-1</sup> foi administrada em um grupo controle adicional (Salina PEIsR), 30 minutos antes da

injeção de solução salina ( $10 \text{ mL kg}^{-1}$ , i.p.), não sendo utilizado o ácido acético como agente de nocicepção. Não foram observadas contrações neste grupo, demonstrando a ausência de interferência da manogalactana no teste de nocicepção (FIGURA 48).

Outra manogalactana, com massa molar de  $2,4 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$ , isolada do extrato aquoso frio de corpos frutíferos de *P. pulmonarius* também demonstrou atividade antinociceptiva, reduzindo em 93% o número de contorções induzida por ácido acético em camundongos, na dose de  $30 \text{ mg kg}^{-1}$  (SMIDERLE *et al.*, 2008b). Este teste foi conduzido com uma dose 10 vezes maior de manogalactana que a utilizada no presente trabalho, mas a massa molecular é, aproximadamente, 3 vezes menor.

Embora o teste de contorção apresente uma baixa especificidade na detecção do efeito analgésico de um fármaco, é altamente eficaz como triagem inicial de atividade antinociceptiva (LE BARS *et al.*, 2001).

Assim, para caracterizar melhor a atividade antinociceptiva da manogalactana isolada do caldo de cultivo, foi realizado o teste de formalina (FIGURA 49), que promove uma resposta mais específica quando comparado ao teste de contorção abdominal. Além disto, o teste de formalina é considerado um modelo experimental que se aproxima da dor clínica (TJØLSEN e HOLE, 1997). A principal característica deste teste é a presença de duas fases distintas de nocicepção: a dor neurogênica e a dor inflamatória. A primeira fase (dor neurogênica) começa imediatamente após a injeção de formalina, com duração de 5 minutos e está associada com a estimulação química direta das fibras aferentes e a liberação de mediadores pró-inflamatórios. A segunda fase (dor inflamatória) ocorre entre 20 a 30 minutos após a injeção de formalina e está relacionada com a liberação de mediadores pró-inflamatórios, tais como a bradicinina, prostaglandinas e serotonina (HUNSKAAR e HOLE, 1987).

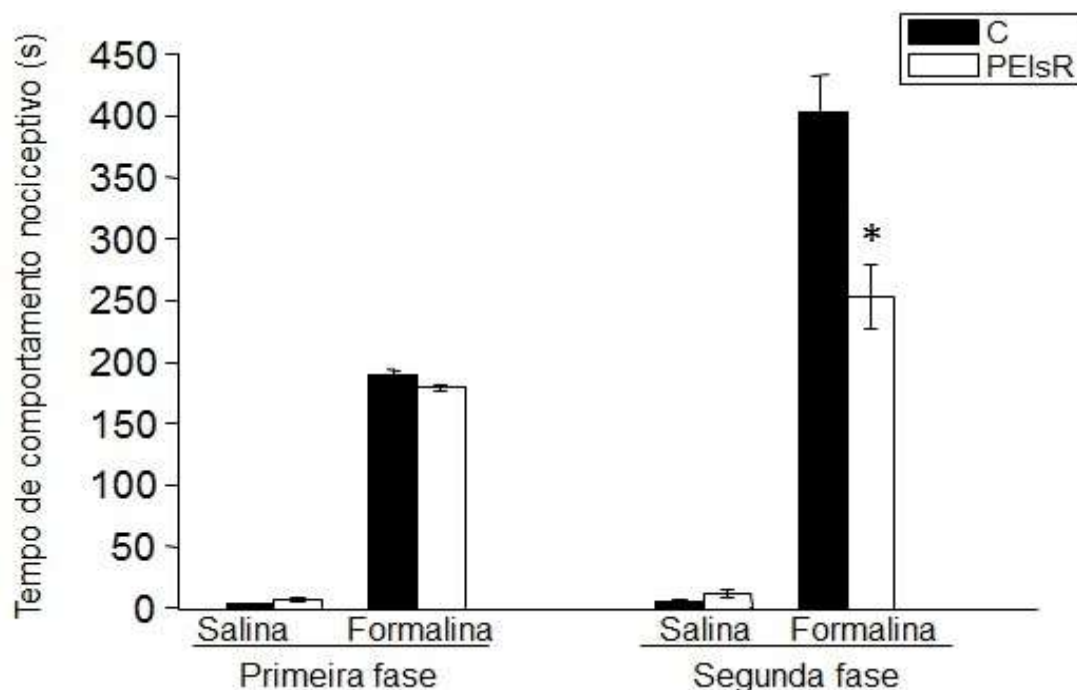


FIGURA 49 – EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DA MANOGALACTANA (PEIsR) DERIVADA DO CALDO DE CULTIVO DE *P. sajor-caju* SOBRE O COMPORTAMENTO NOCICEPTIVO NA PRIMEIRA E SEGUNDA FASES DO TESTE DE FORMALINA EM CAMUNDONGOS.

Os resultados representam os valores médios  $\pm$  desvio padrão ( $n = 8$ ). Legenda: grupo controle não tratado (C: solução carboximetilcelulose 0,5 %, 10 mL kg<sup>-1</sup>, i.p.), grupo tratado com manogalactana (PEIsR: 0,1 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.), 30 minutos antes da administração de salina ou de formalina.

\* Indica a existência de diferença significativa entre o grupo tratado com manogalactana (PEIsR) e o grupo controle não tratado C,  $p < 0,05$ .

No teste de formalina (FIGURA 49), os animais que receberam a manogalactana (PEIsR na dose de 0,1 mg kg<sup>-1</sup>) ou o veículo (C) antes da injeção de formalina não apresentaram diferença significativa no tempo de nocicepção para a primeira fase ( $179,2 \pm 2,8$  s e  $189,7 \pm 4,4$  s, respectivamente). Estes resultados sugerem que a manogalactana não tem efeito na primeira fase de nocicepção induzida por formalina. No entanto, na segunda fase, o grupo tratado com a manogalactana exibiu um tempo de nocicepção de  $253,0 \pm 26,2$  s, enquanto o grupo controle não tratado (C) apresentou um tempo de  $402,2 \pm 25,7$  s. Estes dados sugerem que a manogalactana foi eficiente em reduzir em 37% a nocicepção induzida por formalina na segunda fase do teste.

Para confirmar que o tratamento com a manogalactana não causa nocicepção, dois grupos receberam o veículo (C) e a manogalactana ( $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ ) 30 minutos antes da injeção intraplantar de salina, em vez de formalina. Os tempos de comportamento nociceptivo durante a primeira fase ( $3,0 \pm 1,2 \text{ s}$  e  $6,3 \pm 1,9 \text{ s}$ , respectivamente) e a segunda fase ( $5,3 \pm 1,6 \text{ s}$  e  $11,7 \pm 3,2 \text{ s}$ , respectivamente) são insignificantes, demonstrando que a manogalactana não causa interferência no teste em relação ao aumento de nocicepção (FIGURA 49).

Em função da significativa inibição observada na segunda fase do teste de formalina, é possível sugerir que a manogalactana atue modulando a síntese de mediadores pró-inflamatórios, como a histamina, serotonina, bradicinina e prostaglandinas, que são recrutados após a injúria tecidual causada por formalina (TJØLSEN *et al.*, 1992). Sabe-se que medicamentos anti-inflamatórios (esteroidais e não-esteroidais) reduzem o tempo de comportamento nociceptivo na segunda fase do teste de formalina porque atuam como bloqueadores da síntese de mediadores inflamatórios (FU *et al.*, 2000).

Em seguida, foi avaliada a atividade anti-edematogênica da manogalactana utilizando o teste de edema de pata promovido por carragenina (FIGURA 50), que promove o edema de pata por administração de 1% de carragenina ( $30 \mu\text{L}$ ) na região intraplantar inferior. Este modelo de inflamação aguda é dividido em três fases. A primeira fase (fase rápida) é detectada, aproximadamente, uma hora após a injeção de carragenina e causa um aumento na permeabilidade vascular mediada por liberação de histamina e serotonina. A segunda fase (permeabilidade vascular) ocorre devido à liberação de cininas após, aproximadamente, duas horas. A terceira fase (fase tônica) ocorre três horas após a injeção de carragenina e é considerada a fase de maior intensidade. Durante esta fase, o aumento da permeabilidade vascular está relacionado com a liberação de prostaglandinas (DI ROSA, 1972).

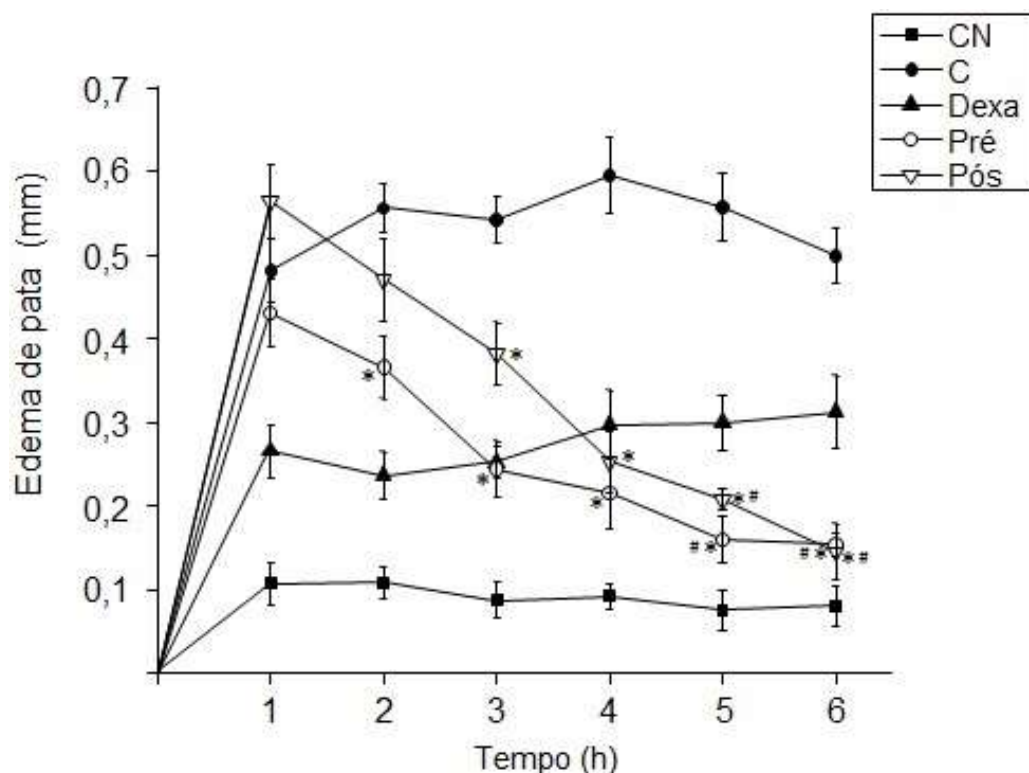


FIGURA 50 – EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DA MANOGALACTANA (PEIsR) DERIVADA DO CALDO DE CULTIVO DE *P. sajor-caju* SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS.

Os resultados representam os valores médios  $\pm$  desvio padrão ( $n=8$ ). Legenda: grupo controle negativo (CN: solução carboximetilcelulose 0,5 %, 10 mL kg<sup>-1</sup>, i.p.), sem injeção de carragenina, grupo controle não tratado (C: solução carboximetilcelulose 0,5 %, 10 mL kg<sup>-1</sup>, i.p.), grupo dexametasona (DEXA: solução dexametasona 1 %, 10 mL kg<sup>-1</sup>, i.p.), grupo pré tratado com manogalactana (Pré: 0,1 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.), 30 minutos antes da injeção de carragenina, grupo pós tratado com manogalactana (Pós: 0,1 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.), 30 minutos após a injeção de carragenina.

\* Indica a existência de diferença significativa entre o grupo tratado com manogalactana (Pré ou Pós) e o grupo controle não tratado C,  $p < 0,05$ .

# Indica a existência de diferença significativa entre o grupo tratado com manogalactana (Pré ou Pós) e o grupo tratado com dexametasona (DEXA),  $p < 0,05$ .

O grupo tratado com manogalactana 30 minutos antes da injeção de carragenina (grupo Pré) demonstrou uma redução significativa do edema de pata a partir de 2 horas após o início do teste, quando comparado com o grupo controle não tratado (C) (FIGURA 52). O edema de pata de todos os grupos foi observado por 6

horas. Para o grupo pré-tratado (Pré) ( $0,15 \pm 0,01$ ) foi observada uma redução de 70% no edema de pata em relação ao grupo controle não tratado (C) ( $0,50 \pm 0,03$ ) após 6 horas de teste. O grupo controle tratado com dexametasona (DEXA), um anti-inflamatório esteroidal comercial, demonstrou uma redução de 38% ( $0,31 \pm 0,04$ ) do edema de pata em 6 horas de teste em relação ao grupo controle não tratado (C) (FIGURA 50). Anti-inflamatórios não-esteroidais comerciais, como a indometacina, também podem ser utilizados como controle para este teste (IM *et al.*, 2014).

Quando a manogalactana foi administrada 30 minutos após a injeção de carragenina (Pós) (FIGURA 50), foi observada uma redução do edema de pata estatisticamente significativa a partir de 3 horas de teste, quando comparado com o grupo não tratado (C), obtendo-se 72% ( $0,14 \pm 0,03$ ) de redução em 6 horas de teste.

Comparando os grupos Pré e Pós com o grupo controle tratado com dexametasona (DEXA), observa-se uma diferença significativa do edema de pata a partir de 5 horas de teste. Em 6 horas, os grupos Pré e Pós apresentaram uma redução de edema de pata 52% e 55% maior do que a redução observada para a DEXA, respectivamente, indicando que a manogalactana tem atividade anti-inflamatória (FIGURA 50).

Em função do tempo necessário para a obtenção de um efeito de redução do edema de pata estatisticamente significativo em relação ao grupo controle não tratado, sugere-se que a manogalactana promove resposta anti-inflamatória em função do controle de liberação de cininas, em especial, de prostaglandinas (TJØLSEN *et al.*, 1992; FU *et al.*, 2000).

Portanto, os resultados dos ensaios biológicos mostraram que a manogalactana exibe atividade antinociceptiva quando avaliada pelos testes de ácido acético e de formalina. Neste último teste, o efeito antinociceptivo ocorreu durante a fase inflamatória. Além disso, o teste de carragenina demonstrou que a manogalactana é capaz de reduzir o edema da pata. Os resultados sugerem que o exopolissacarídeo de *P. sajor-caju* atua como um agente anti-inflamatório, uma vez que reduz o edema e a nocicepção, que são duas características do processo inflamatório.

### 6.3.2 $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-ligada

Este polímero faz parte da parede celular dos fungos (CHEN e SERVIOUR, 2007; CHEN e CHEUNG, 2014) e sua atividade antinociceptiva e anti-inflamatória já foram relatadas (SMIDERLE *et al.*, 2008a, BAGGIO *et al.*, 2010, BAGGIO *et al.*, 2012). Para este trabalho foi testada a  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-ligada (GHW) derivada do corpo frutífero de *P. sajor-caju*. Este polímero foi escolhido para a realização dos testes biológicos em função do alto rendimento obtido (81,5 %) quando comparado ao rendimento das  $\beta$ -D-glucanas (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-ligadas U100R-SHW (4,9%) e M-U3SHW (6,5%), derivadas dos corpos frutíferos e da biomassa micelial, respectivamente, e também por apresentar uma quantidade maior de unidades de glucose 3,6-di-O-substituídas, ou seja uma maior quantidade de ramificações, em relação a mesma estrutura isolada da biomassa micelial.

A atividade antinociceptiva da  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-ligada (GHW) foi avaliada usando o teste de contorção abdominal (FIGURA 53).

A  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-ligada (GHW) apresentou efeito estatisticamente significativo para a redução no número de contorções abdominais induzido por ácido acético para todas as doses testadas (0,1 a 100 mg kg<sup>-1</sup>) quando comparadas ao grupo controle não tratado (C) (FIGURA 51). Avaliando as doses testadas para a redução do número de contorções, as doses de 1,0 mg kg<sup>-1</sup> (18,5  $\pm$  5,6 un), 10 mg kg<sup>-1</sup> (17,3  $\pm$  2,8 un) e 100 mg kg<sup>-1</sup> (4,1  $\pm$  3,1 un) apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação à dose de 0,1 mg kg<sup>-1</sup> (35,3  $\pm$  3,7 un), e as doses de 1 e 10 mg kg<sup>-1</sup> para a dose de 100 mg kg<sup>-1</sup>, sendo esta última a que promoveu maior redução de contorções (93%) quando comparada ao grupo controle não tratado.

Trabalhos relatam que a  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-ligada tem capacidade de reduzir a nocicepção induzida por ácido acético. Este polímero derivado do extrato aquoso quente de corpos frutíferos de *P. pulmonarius* apresentou 85% de inibição de nocicepção na dose de 3 mg kg<sup>-1</sup> (i.p.) (SMIDERLE *et al.*, 2008a).

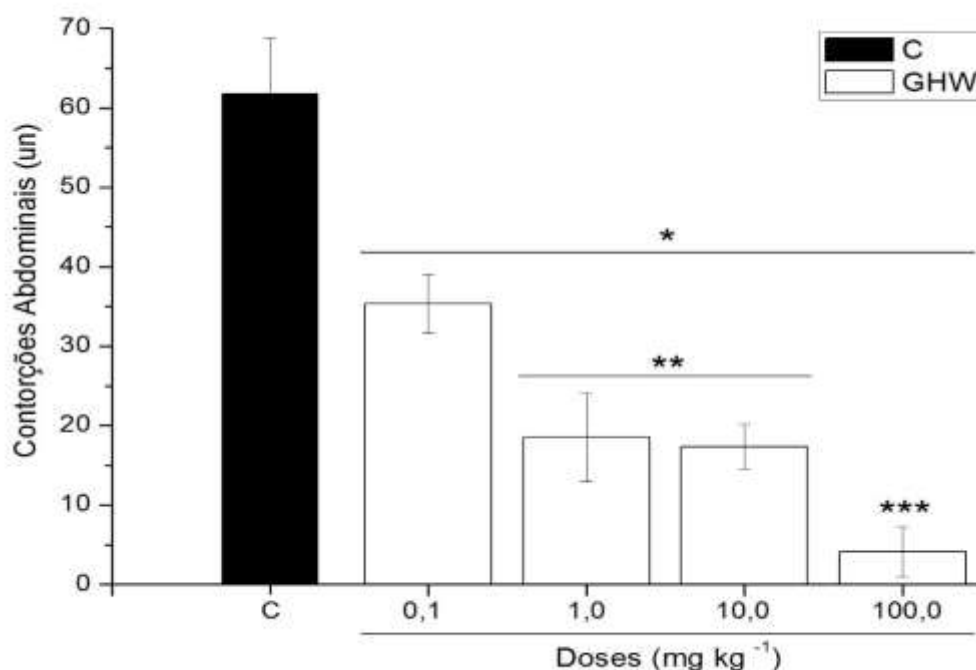


FIGURA 51 – EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DA  $\beta$ -D-GLUCANA (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-LIGADA (GHW) DERIVADA DOS CORPOS FRUTÍFEROS DE *P. sajor-caju* SOBRE O NÚMERO DE CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS POR ÁCIDO ACÉTICO EM CAMUNDONGOS.

Os resultados representam os valores médios  $\pm$  desvio padrão ( $n = 8$ ). Legenda: grupo controle não tratado (C: solução carboximetilcelulose 0,5 %, 10 mL kg<sup>-1</sup>, i.p.), grupo tratado com  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-ligada (GHW: 0,1, 1,0, 10, 100 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.) 30 minutos antes da injeção de ácido acético.

\* Indica a existência de diferença significativa entre o grupo tratado com GHW e o grupo controle não tratado (C),  $p < 0,05$ . \*\* e \*\*\* Indicam a existência de diferença significativa entre os grupos tratados com GHW (0,1, 1,0, 10, 100 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.),  $p < 0,05$ .

Quando a nocicepção foi induzida por formalina, não foi observado efeito para as doses de 10 e 100 mg kg<sup>-1</sup> de  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-ligada (GHW) na primeira fase do teste em relação ao grupo controle não tratado ( $209,0 \pm 23,3$  s;  $201,3 \pm 5,9$  s;  $199,6 \pm 15,3$  s, respectivamente) (FIGURA 52).



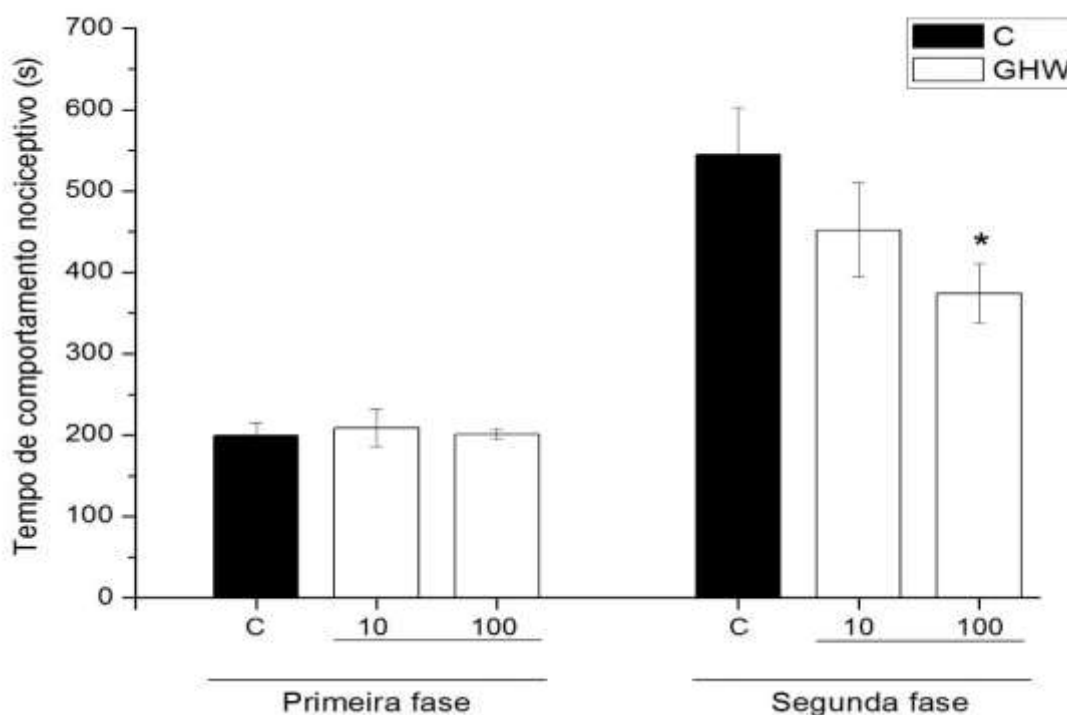


FIGURA 52 – EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DA  $\beta$ -D-GLUCANA (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-LIGADA (GHW) DERIVADA DOS CORPOS FRUTÍFEROS DE *P. sajor-caju* SOBRE O COMPORTAMENTO NOCICEPTIVO NA PRIMEIRA E SEGUNDA FASES DO TESTE DE FORMALINA EM CAMUNDONGOS.

Os resultados representam os valores médios  $\pm$  desvio padrão ( $n = 8$ ). Legenda: grupo controle não tratado (C: solução carboximetilcelulose 0,5 %, 10 mL kg<sup>-1</sup>, i.p.), grupo tratado com  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-ligada (GHW: 10 e 100 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.), 30 minutos antes da injeção de formalina.

\* Indica a existência de diferença significativa entre o grupo tratado com GHW e o grupo controle não tratado (C),  $p < 0,05$ .

Entretanto, o polímero GHW apresentou uma redução no tempo de comportamento nociceptivo para as doses de 10 e 100 mg kg<sup>-1</sup> na segunda fase do teste de formalina (FIGURA 52), sendo que a dose de 100 mg kg<sup>-1</sup> apresentou uma redução estatisticamente significativa (374,1  $\pm$  36,7 s) quando comparada ao controle não tratado (C) (544,6  $\pm$  58,5 s), representando uma taxa de redução do comportamento nociceptivo. Isto sugere que a  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-ligada pode apresentar efeito sobre a liberação de mediadores pró-inflamatórios, pois esta

segunda fase do teste se relaciona à dor do tipo inflamatória (HUNSKAAR e HOLE, 1987).

A  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-ligada derivada do extrato aquoso quente de corpos frutíferos de *P. pulmonarius*, na dose de 30 mg kg<sup>-1</sup>, promoveu a redução de 43% e 96% na primeira e segunda fases do teste de formalina, respectivamente (SMIDERLE *et al.*, 2008a) e inibição de 96% na dose de 10 mg kg<sup>-1</sup>, para nocicepção induzida por glutamato (BAGGIO *et al.*, 2010). Quando foram utilizados como agentes indutores de nocicepção a capsaicina e o cinamaldeído, a glucana deste mesmo fungo, na dose de 30 mg kg<sup>-1</sup>, promoveu uma inibição da resposta nociceptiva de 92 % e 67 %, respectivamente (BAGGIO *et al.*, 2012).

Para observar se a  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-ligada possui atividade anti-edematogênica foi realizado o teste de edema de pata induzido por carragenina (FIGURA 53).

O polímero GHW inibiu o desenvolvimento de edema de pata em 42% na dose de 100 mg kg<sup>-1</sup> em 6 h (0,29 $\pm$ 0,06 mm), quando comparado ao controle não tratado (0,49 $\pm$ 0,03 mm) e apresentou um resultado semelhante ao grupo tratado com dexametasona durante as 6 horas de teste (FIGURA 53).

Assim, pode-se sugerir que a  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-ligada derivada do extrato aquoso quente dos corpos frutíferos de *P. sajor-caju* apresenta atividade antinociceptiva quando avaliada pelos testes de ácido acético e de formalina. Neste último, o efeito antinociceptivo ocorreu durante a segunda fase, caracterizada como dor inflamatória. O teste de carragenina demonstrou que a  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-ligada é capaz de reduzir o edema da pata, atuando como agente anti-inflamatório, com efeito semelhante ao da dexametasona.

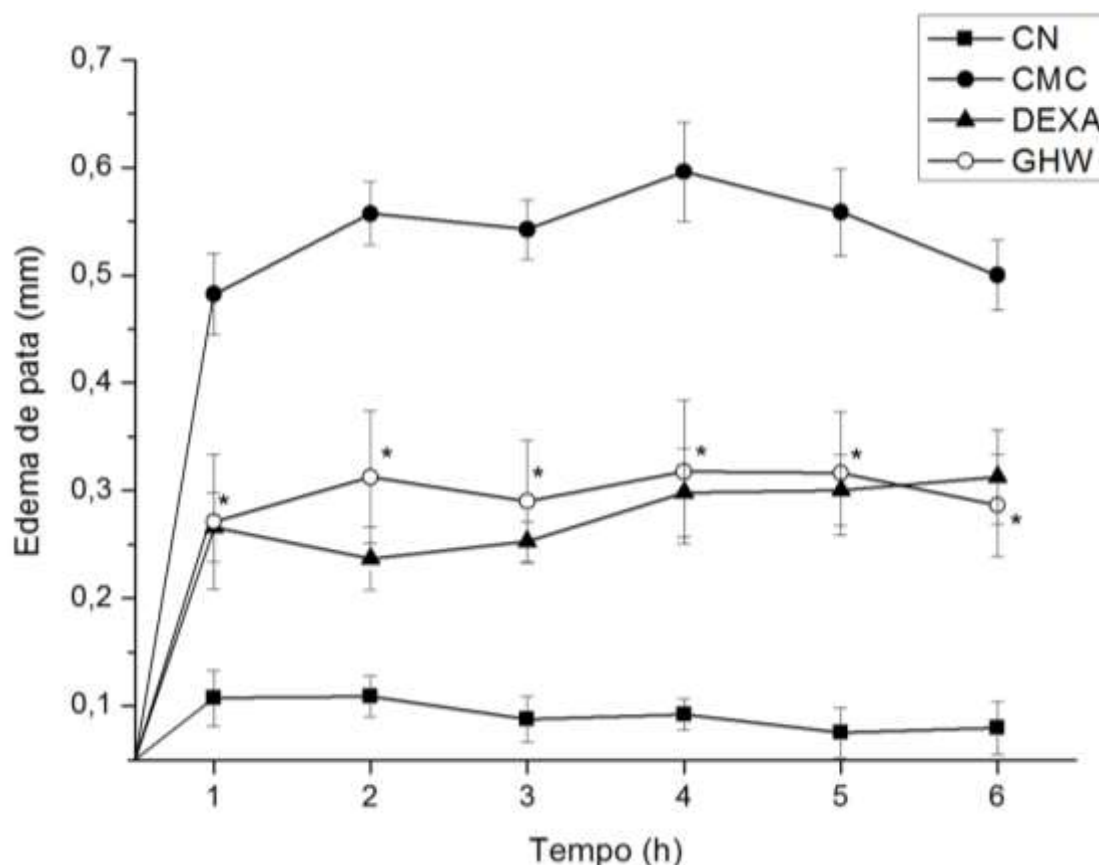


FIGURA 53 – EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DA  $\beta$ -D-GLUCANA (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-LIGADA (GHW) DERIVADA DOS CORPOS FRUTÍFEROS DE *P. sajor-caju* SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS.

Os resultados representam os valores médios  $\pm$  desvio padrão (n=8). Legenda: grupo controle negativo (CN: solução de carboximetilcelulose 0,5 %, 10 ml kg<sup>-1</sup>, i.p.), sem injeção de carragenina, grupo controle não tratado (C: solução carboximetilcelulose 0,5 %, 10 mL kg<sup>-1</sup>, i.p.), grupo tratado com dexametasona (DEXA: solução de dexametasona 1 %, 10 ml kg<sup>-1</sup>, i.p.), grupo tratado com  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-ligada (GHW: 100 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.), 30 minutos antes da injeção de carragenina.

\* Indica a existência de diferença significativa entre o grupo tratado com GHW e o grupo controle não tratado (C),  $p < 0,05$ .

### 6.3.3 $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3)-ligada

#### 6.3.3.1 Ensaios *in vitro*

A  $\beta$ -D-glucana linear (1 $\rightarrow$ 3)-ligada (G-PHW) derivada dos corpos frutíferos de *P. sajor-caju* foi testada sobre células THP-1. Então, a fração G-PHW foi adicionada aos macrófagos THP-1 nas doses de 10, 50 e 250  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> e a expressão dos genes

pró-inflamatórios (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e COX-2) foi avaliada. Para os períodos de incubação de 3 e 6 horas, o G-PHW demonstrou um estímulo estatisticamente significativo para a produção de mRNA de IL-1 $\beta$  e COX-2, enquanto para o mRNA de TNF- $\alpha$  observou-se uma produção significativa após 3 horas de tratamento (FIGURA 54).

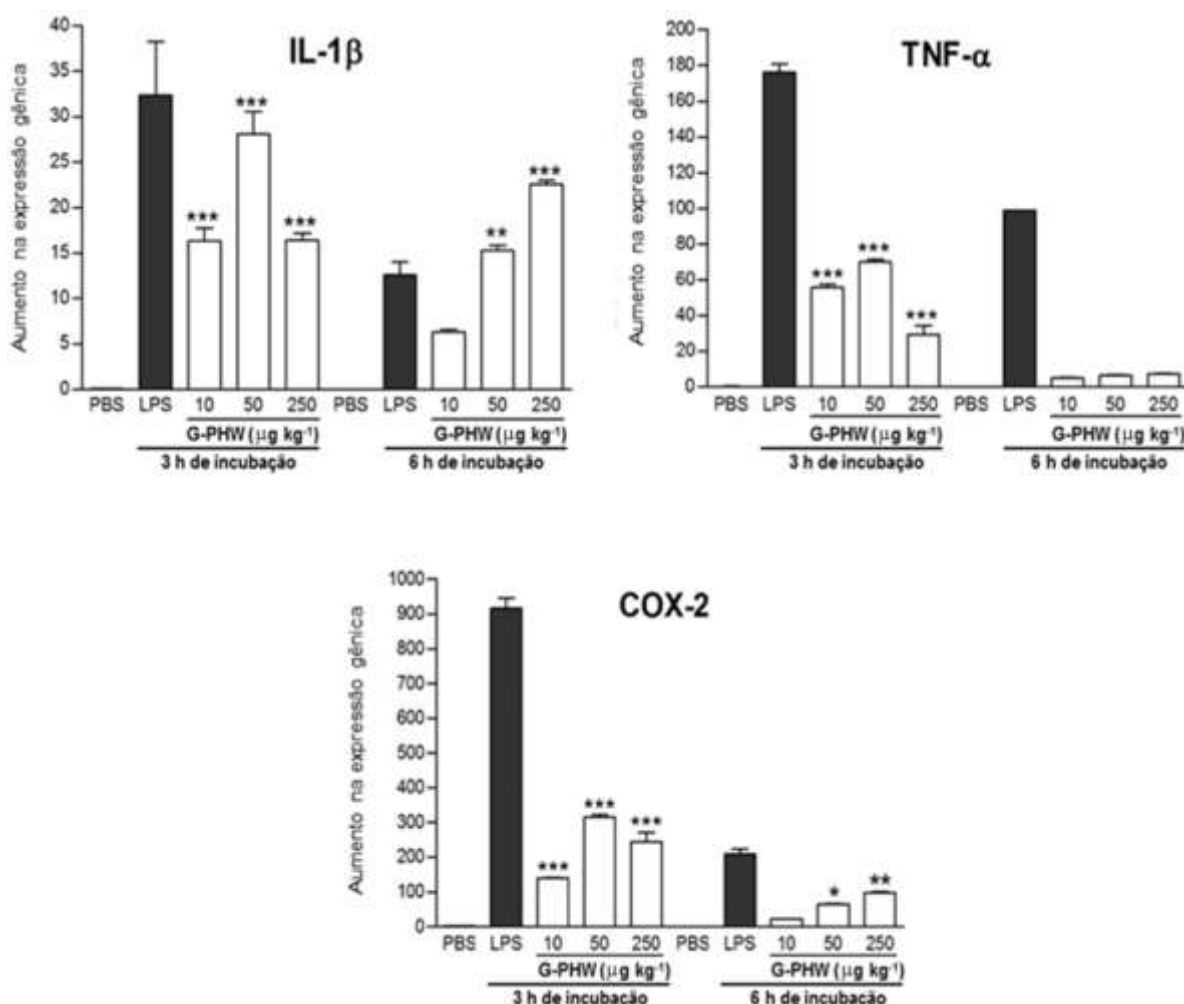


FIGURA 54 – EXPRESSÃO RELATIVA DOS NÍVEIS DE mRNA PARA OS GENES DE IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  E COX-2 APÓS TRATAMENTO DE MACRÓFAGOS THP-1 COM G-PHW POR 3 E 6 HORAS.

Os resultados representam os valores médios  $\pm$  desvio padrão para cultivos em duplicata. Legenda: grupo controle negativo (PBS: solução salina tamponada com fosfato, 50  $\mu$ L mL $^{-1}$ ), grupo controle tratado com LPS (LPS: 1  $\mu$ g mL $^{-1}$ ) e grupo tratado com  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3)-ligada linear (G-PHW: 10, 50 e 250  $\mu$ g mL $^{-1}$ ).

\* Indica a existência de diferença significativa entre o grupo tratado com G-PHW e o grupo controle LPS,  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

Com o objetivo de testar a capacidade da glucana em reduzir os efeitos causados pela atuação de um agente inflamatório, 1  $\mu$ g mL $^{-1}$  de LPS foi adicionado às

células de THP-1 juntamente com 10, 50 e 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  da fração G-PHW (FIGURA 55). As células demonstraram uma diminuição significativamente estatística para a expressão de mRNA de  $\text{TNF-}\alpha$ , com inibição de  $61,8 \pm 5,74\%$  para a dose de 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em 3 h e de  $77,5 \pm 0,99\%$  para a dose de 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em 6 h. A expressão de mRNA para  $\text{IL-1}\beta$  apresentou inibição estatisticamente significativa de  $37,0 \pm 0,67\%$  em 3 horas para a dose de 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de G-PHW, enquanto para  $\text{COX-2}$  demonstrou inibição de  $63,6 \pm 2,76\%$  no mesmo tempo e mesma dose.

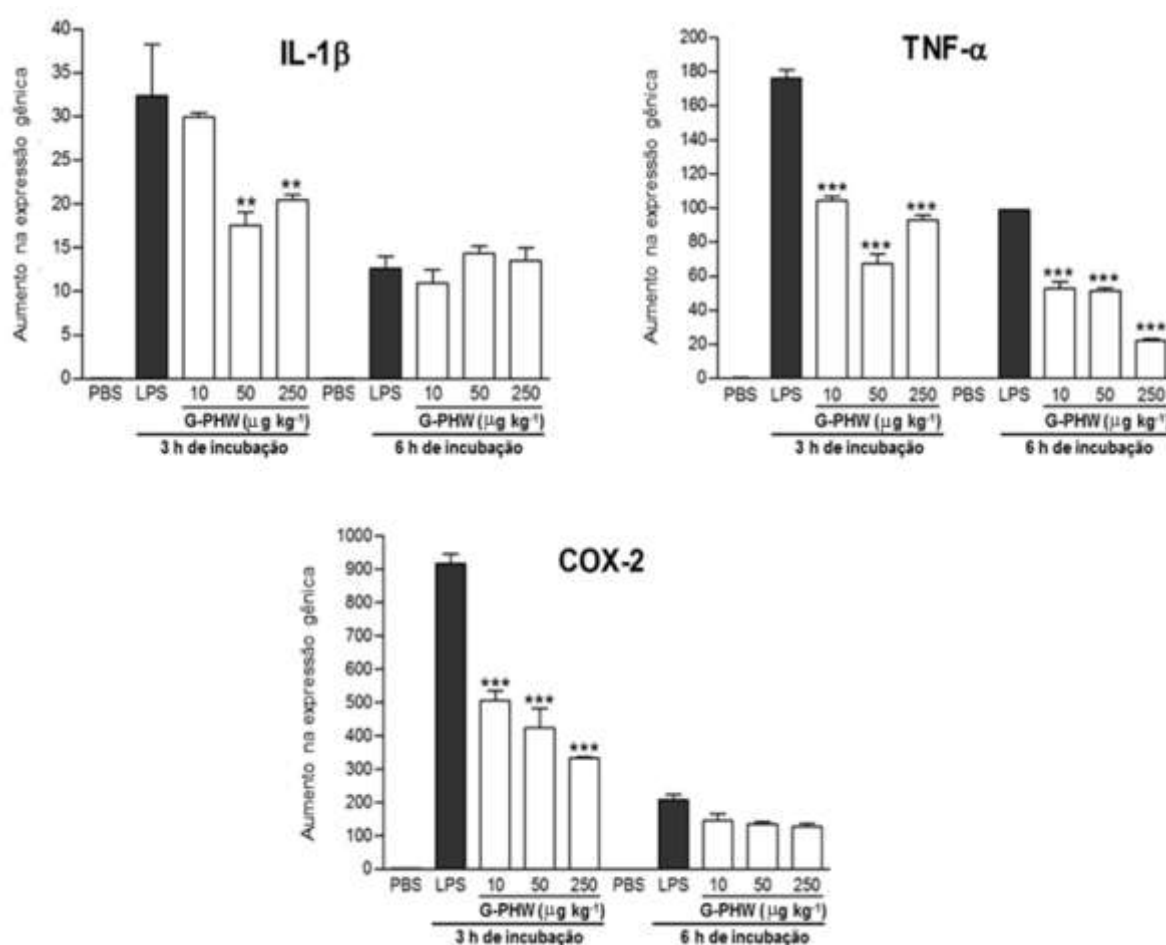


FIGURA 55 – EXPRESSÃO RELATIVA DOS NÍVEIS DE mRNA PARA OS GENES DE  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{TNF-}\alpha$  E  $\text{COX-2}$  APÓS TRATAMENTO DE MACRÓFAGOS THP-1 COM LPS + G-PHW POR 3 E 6 HORAS.

Os resultados representam os valores médios  $\pm$  desvio padrão para cultivos em duplicata. Legenda: grupo controle negativo (PBS: solução salina tamponada com fosfato, 50  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ), grupo controle tratado com LPS (LPS: 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e grupo tratado com  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3)-ligada linear (G-PHW: 10, 50 e 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

\* Indica a existência de diferença significativa entre o grupo tratado com G-PHW e o grupo controle LPS,  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Estes resultados (FIGURAS 54 e 55) sugerem que a  $\beta$ -D-glucana linear (1 $\rightarrow$ 3)-ligada exibe efeito imunomodulatório sobre macrófagos THP-1, estimulando a produção de genes pró-inflamatórios quando incubados sozinhos, no entanto, inibem esta produção quando administrados junto com LPS, um forte agente inflamatório.

A partir de corpos frutíferos de *Agaricus bisporus* e *A. brasiliensis*, foram isoladas  $\beta$ -D-glucanas (1 $\rightarrow$ 6)-ligadas que também exibiram efeito imunomodulatório quando incubadas com macrófagos THP-1 (SMIDERLE *et al.*, 2013). As glucanas, quando incubadas com os macrófagos, foram capazes de estimular a expressão de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e COX-2, porém, em presença de LPS, um efeito inibitório foi observado para os genes de IL-1 $\beta$  e COX-2. A partir do extrato aquoso quente de corpos frutíferos de *P. florida*, outra  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 6)-ligada (PS-I) foi isolada e demonstrou capacidade de aumentar a produção de óxido nítrico (NO) em 127% na dose de 200  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> em macrófagos peritoneais (DEY *et al.*, 2012). NO é um radical livre produzido por macrófagos ativados, que promove danos celulares devido a sua capacidade de ligar-se à enzimas envolvidas na respiração celular (QUEIROZ e BATISTA, 1999).

Do extrato aquoso quente de corpos frutíferos de *P. sajor-caju* foi obtida uma  $\beta$ -D-glucana ramificada (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-ligada ( $9,75 \times 10^5$  g mol<sup>-1</sup>) que não afetou a viabilidade celular de macrófagos e promoveu um aumento de produção de óxido nítrico (NO) e na liberação de citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , apresentando um efeito imunoestimulante (CARBONERO *et al.*, 2012). Efeito semelhante foi observado para os extratos aquoso e alcalino de corpos frutíferos de *P. tuber-regium*, em relação à produção de óxido nítrico e liberação de citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (WU *et al.*, 2014).

A curdulana, uma  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3)-ligada (Sigma) ativou a produção de IL-1 $\beta$  por macrófagos, devido ao reconhecimento pelo receptor Dectina-1 (KANKKUNEN *et al.*, 2010).

Pesquisadores têm observado que os receptores de células imunes (como Dectina-1, receptor complemento CR3, lactosilceramida e TLR-2 e TLR-4) reconhecem as  $\beta$ -D-glucanas e iniciam a resposta imunológica (CHEN e SEVIOUR, 2007). Adams *et al.* (2008) estudaram a interação entre o receptor Dectina-1 e glucanas com diferentes tipos de cadeia principal, diferentes graus de ramificação e graus de polimerização na cadeia ramificada. Em relação ao tipo de cadeia principal, a Dectina-1 somente reconheceu os polímeros com cadeia principal de  $\beta$ -D-glucana

(1→3)-ligada. Em relação ao grau de polimerização, sete unidades de glucose (1→3)-ligada foram necessárias para que a ligação entre o polímero e o receptor fosse efetiva, sendo que, a afinidade do receptor pelo polissacarídeo aumenta com o aumento de unidades de glucose da cadeia principal. Duas  $\beta$ -D-glucana ramificada (1→3),(1→6)-ligada chamadas de laminarina e scleroglucana foram avaliadas quanto a afinidade de ligação à Dectina-1. Laminarina apresenta uma relação entre as unidades  $\beta$ -D-Glcp 3-O-substituídas e  $\beta$ -D-Glcp 3,6-di-O-substituídas de 10:1, enquanto a scleroglucana apresenta uma relação de 2:1 entre estas unidades. Os resultados demonstraram uma maior afinidade de ligação para a laminarina em relação a scleroglucana, confirmando a importância do grau de ramificação das glucanas para ligação no receptor Dectina-1 (ADAMS *et al.*, 2008).

Assim, a ligação entre o receptor (Dectina-1) e a glucana estimula a cascata de resposta imunológica, incluindo a produção de citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-10), INF- $\delta$  e TNF- $\alpha$  (KOZARSKI *et al.*, 2014).

Para obter mais informações sobre a atuação da  $\beta$ -D-glucana (1→3)-ligada isolada dos corpos frutíferos de *P. sajor-caju* sobre o sistema biológico, ensaios *in vivo* foram realizados.

#### 6.3.3.2 Ensaios *in vivo*

Estudos prévios têm demonstrado que a  $\beta$ -D-glucana ramificada (1→3),(1→6)-ligada isolada de *P. sajor-caju* exibe efeitos antineoplásicos e imunoestimulatório e modulador da expressão de alguns marcadores inflamatórios (CARBONERO *et al.*, 2012; DALONSO *et al.*, 2010) Também foi observado que  $\beta$ -D-glucanas (1→3),(1→6)-ligadas de *P. pulmonarius* e *Lactarius rufus* exibiram efeito acentuado antinociceptivo e anti-inflamatório (RUTHES *et al.*, 2013; SMIDERLE *et al.*, 2008a). Ainda, um complexo formado por proteína e  $\alpha$ -D-glucana (1→3),(1→6)-ligada isolado de *P. sajor-caju* promoveu estímulo para ativação de macrófagos, incluindo a produção de óxido nítrico e TNF- $\alpha$  (SATITMANWIWAT *et al.*, 2012).

No entanto, não há informação sobre os efeitos biológicos *in vivo* da  $\beta$ -D-glucana linear (1→3)-ligada obtida de espécies de *Pleurotus*. Neste trabalho foi demonstrado que este polímero linear G-PHW apresentou um efeito imunomodulatório

*in vitro*, então, foi realizado um estudo para avaliar suas possíveis propriedades antinociceptivas e anti-inflamatórias *in vivo*.

O teste de formalina foi utilizado para avaliar o efeito antinociceptivo sobre a dor neurogênica e dor inflamatória em camundongos (FIGURA 56).

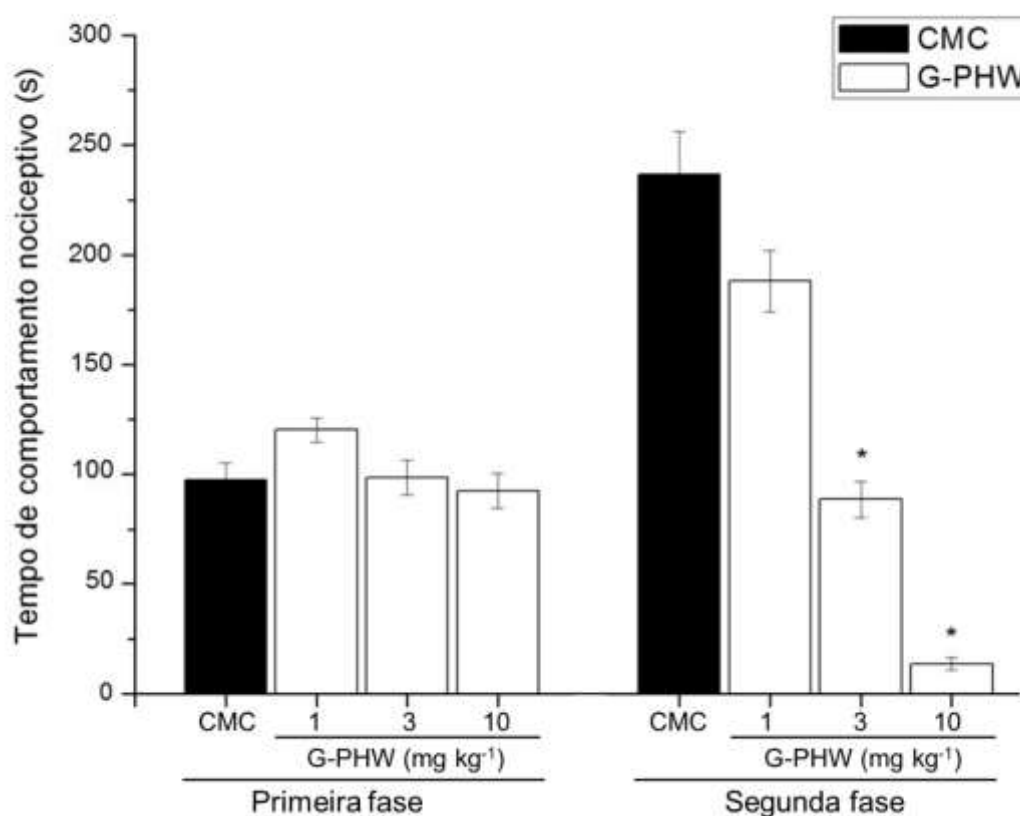


FIGURA 56 – EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DA  $\beta$ -D-GLUCANA (1 $\rightarrow$ 3)-LIGADA (G-PHW) DERIVADA DOS CORPOS FRUTÍFEROS DE *P. sajor-caju* SOBRE O COMPORTAMENTO NOCICEPTIVO NA PRIMEIRA E SEGUNDA FASES DO TESTE DE FORMALINA EM CAMUNDONGOS.

Os resultados representam os valores médios  $\pm$  desvio padrão (n=8). Legenda: grupo controle não tratado (C: solução carboximetilcelulose 0,5 %, 10 mL kg<sup>-1</sup>, i.p.), grupo tratado com  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3)-ligada (G-PHW: 1, 3 e 10 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.), 30 minutos antes da administração de formalina.

\* Indica a existência de diferença significativa entre o grupo tratado com G-PHW e o grupo controle CMC,  $p < 0.05$ .

Os resultados observados na Figura 56 demonstraram que a administração intraperitoneal de  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3)-ligada (G-PHW) não reduziu a resposta nociceptiva da dor neurogênica (primeira fase), mas apresentou uma inibição



estatisticamente significativa para a segunda fase, que representa a nocicepção de dor inflamatória induzida por formalina, nas doses de 3 e 10 mg kg<sup>-1</sup>, quando comparadas ao grupo controle (CMC). Para a dose de 10 mg kg<sup>-1</sup> foi observada uma inibição de 98% para a segunda fase do teste de formalina (FIGURA 56).

A partir de uma  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-ligada de *L. rufus* foi produzida, por degradação controlada de Smith, uma  $\beta$ -D-glucana linear (1 $\rightarrow$ 3)-ligada (RUTHES *et al.*, 2013). O polímero linear exibiu efeito antinociceptivo para a fase neurogênica (58  $\pm$  4%) e sobre a fase inflamatória (80  $\pm$  9%) para a dose de 30 mg kg<sup>-1</sup>. Considerando a dose utilizada, a redução na fase inflamatória foi menos potente que a observada por este estudo.

Como a  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3)-ligada (G-PHW) apresentou efeito sobre a dor inflamatória (segunda fase do teste de formalina), o seu efeito anti-inflamatório foi avaliado. Em função da pequena quantidade de G-PHW não foi possível realizar esta avaliação pelo teste de edema de pata induzido por carragenina. O método escolhido para avaliar o efeito anti-inflamatório foi o da peritonite induzida por injeção intraperitoneal de LPS. Para isto, o LPS foi administrado na dose de 2  $\mu$ g kg<sup>-1</sup> (i.p.), para promover uma resposta inflamatória aguda que foi avaliada em função do número total de leucócitos (FIGURA 57A) pois, com a indução do processo inflamatório há um aumento de neutrófilos e do número total de leucócitos (SMIDERLE *et al.*, 2014)

Após 4 h da administração de LPS, foi observado um aumento de 131% no número total de leucócitos presentes no líquido peritoneal para o grupo LPS (6,90  $\pm$  0,62 x 10<sup>6</sup> células) quando comparado com o grupo controle controle C (2,99  $\pm$  0,44 x 10<sup>6</sup> células) (FIGURA 57A). O grupo tratado com dexametasona (DEXA) apresentou uma migração de leucócitos totais semelhante ao grupo controle C e 100% menor quando comparado com o grupo LPS (FIGURA 57A). Os grupos tratados com G-PHW nas doses de 1, 3 e 10 mg kg<sup>-1</sup> (i.p.) demonstraram uma redução significativa no número total de leucócitos (73%, 94% e 100%, respectivamente) quando comparados ao grupo LPS (FIGURA 57A).

O mesmo comportamento foi observado quando foram avaliadas as concentrações de mieloperoxidase (MPO) (FIGURA 57B), um marcador indireto de neutrófilos. Foi observado um aumento de 190% nos nível de MPO para o grupo LPS

( $0,29 \pm 0,07$  OD mL<sup>-1</sup>) quando comparado ao grupo controle C ( $0,10 \pm 0,01$  OD mL<sup>-1</sup>). Os grupos tratados com G-PHW (1, 3 e 10 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.) e dexametasona reduziram os níveis de MPO em 84%, 76%, 84% e 94%, respectivamente, quando comparados ao grupo LPS (FIGURA 57B).

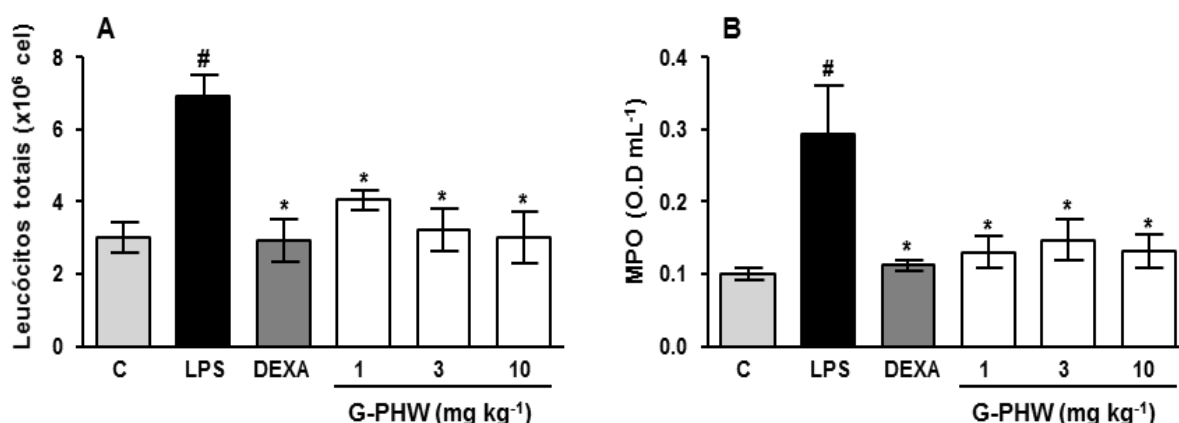


FIGURA 57 - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DA  $\beta$ -D-GLUCANA (1 $\rightarrow$ 3)-LIGADA (G-PHW) DERIVADA DOS CORPOS FRUTÍFEROS DE *P. sajor-caju* SOBRE O NÚMERO TOTAL DE LEUCÓCITOS (A) E CONCENTRAÇÃO DE MIELOPEROXIDASE (B) INDUZIDA POR LPS EM CAMUNDONGOS.

Os resultados representam os valores médios  $\pm$  desvio padrão (n=8). Legenda: grupo controle sem injeção de LPS (C: solução carboximetilcelulose 0,5 %, 10 mL kg<sup>-1</sup>, i.p.), grupo controle não tratado com injeção de LPS (LPS: solução carboximetilcelulose 0,5 %, 10 mL kg<sup>-1</sup>, i.p.), grupo tratado com dexametasona (DEXA: 0,5 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.), grupo tratado com  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3)-ligada (G-PHW: 1, 3 e 10 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.), 30 minutos antes da administração de LPS.

# Indica a existência de diferença significativa entre o grupo controle C e o grupo controle LPS,  $p < 0,05$ .

\* Indica a existência de diferença significativa entre o grupo tratado com G-PHW e o grupo controle LPS,  $p < 0,05$ .

Estes resultados de redução da migração de leucócitos totais, principalmente de neutrófilos (FIGURA 57), confirmam a atividade anti-inflamatória da estrutura linear  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3)-ligada derivada de *P. sajor-caju*.

#### 6.3.4 Comparação da atividade biológica entre os polissacarídeos testados

A partir dos efeitos biológicos observados neste trabalho para os três polissacarídeos testados, pode-se afirmar que a manogalactana (PEIsR), a  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-ligada (GHW) e a  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3)-ligada (G-PHW) possuem atividade anti-inflamatória.

Quando comparados, observa-se que a manogalactana reduziu em 54%, nas doses de 0,1 a 3,0 mg kg<sup>-1</sup>, a contorção abdominal enquanto a  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-ligada promoveu 93% de redução para a dose de 100 mg kg<sup>-1</sup>.

Para o tempo de comportamento nociceptivo, as atividades foram evidenciadas apenas na segunda fase, sendo que a manogalactana promoveu 37% (na dose de 0,1 mg kg<sup>-1</sup>) de redução de comportamento nociceptivo, a  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-ligada promoveu uma redução de 31% (dose de 100 mg kg<sup>-1</sup>), e a  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3)-ligada reduziu em 98% o comportamento nociceptivo (dose de 10 mg kg<sup>-1</sup>).

Quando foi analisado o efeito dos polímeros sobre o edema de pata induzido por carragenina, observou-se reduções de 70% (dose de 0,1 mg kg<sup>-1</sup>) e 42% (dose de 100 mg kg<sup>-1</sup>) para a manogalactana e  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-ligada, respectivamente.

## 7 CONCLUSÕES

Utilizando o cultivo submerso com meio POL modificado, sem a presença de extrato de levedura, foi obtida uma concentração máxima de EPS de  $0,94 \text{ g L}^{-1}$ , em 256,5 h de cultivo e uma concentração de biomassa micelial de  $3,07 \text{ g L}^{-1}$  neste tempo de cultivo. A produtividade total para biomassa micelial foi de  $11,98 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  e de  $3,68 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  para EPS. O fator de conversão de glucose em biomassa micelial foi de  $0,21 \text{ g g}^{-1}$  e o fator de conversão de glucose em EPS foi de  $0,06 \text{ g g}^{-1}$ . Segundo a classificação de Gaden para processos fermentativos, este cultivo foi classificado como tipo I, indicando que a produção de EPS está associada ao aumento de concentração de biomassa micelial.

Três manogalactanas foram caracterizadas, derivadas do caldo de cultivo (PEIsR), do extrato aquoso frio do corpo frutífero (U100E-SCW) e do extrato aquoso frio da biomassa micelial (SE-SICW).

Três  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-ligada foram extraídas do extrato aquoso quente de corpos frutíferos (GHW e U100R-SHW) e da biomassa micelial (M-U3SHW). Ainda foi observado outra  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-ligada derivada do extrato alcalino do corpo frutífero.

Dois polímeros foram caracterizados como  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3)-ligada, uma estrutura linear, derivada da biomassa micelial (IM-IHW) e do corpo frutífero (G-PHW).

Portanto, este trabalho comprova que os polissacarídeos presentes nos corpos frutíferos produzidos pelo método tradicional (cultivo sólido) podem ser obtidos por cultivo submerso a partir da biomassa micelial e do caldo de cultivo. Assim, a produção em escala industrial poderá ser conduzida por cultivo submerso, apresentando como vantagens em relação ao cultivo sólido em relação ao controle do processo, a condução estéril da produção e o menor tempo de cultivo.

Os resultados dos ensaios biológicos mostraram que a manogalactana (PEIsR) e a  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-ligada (GHW) exibem atividade antinociceptiva e antiedematogênica, sugerindo que atuam como um agente anti-inflamatório. Entretanto a  $\beta$ -D-glucana linear (1 $\rightarrow$ 3)-ligada (G-PHW) apresentou atividade imunomodulatória.

Concluindo esta tese, pode-se afirmar que as estruturas obtidas dos corpos frutíferos também estão presentes no caldo de cultivo e na biomassa micelial, ambos produzidos por cultivo submerso (processo mais controlado quando comparado ao cultivo sólido) e que os polissacarídeos caracterizados possuem atividade anti-inflamatória e imunomoduladora.

## 8 REFERÊNCIAS

ADAMS, D. J. Fungal cell wall chitinases and glucanases. **Microbiology**, v. 150, p. 2029–2035, 2004.

ADAMS, E. L.; RICE, P. J.; GRAVES, B.; ENSLEY, H. E.; YU, H.; BROWN, G. D.; GORDON, S.; MONTEIRO, M. A.; PAPP-SZABO, E.; LOWMAN, D. W.; POWER, T. D.; WEMPE, M. F.; WILLIAMS, D. L. Differential high-affinity interaction of Dectin-1 with natural or synthetic glucans is dependent upon primary structure and is influenced by polymer chain length and side-chain branching. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 325, n.1, p. 115-123, 2008.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**.4 ed., New York: John Wiley & Sons, 1996.

ANPC. Associação Nacional de Produtores de Cogumelos. Disponível em <http://www.anpc.org.br/site/index.php/cogumelos/cogumelos-no-brasil>. Acesso em 21 de julho de 2014.

ASSIS, I. S.; CHAVES, M. B.; SILVEIRA, M. L. L.; GERN, R. M. M.; WISBECK, E.; FURIGO JÚNIOR, A.; FURLAN, S. A. Production of bioactive compounds with antitumor activity against Sarcoma 180 by *Pleurotus sajor-caju*. **Journal of Medicinal Food**, v. 16, n. 11, p. 1004-1012, 2013.

ASPINAL, G. O. General introduction. In: **The polysaccharides**. New York: Academic Press, v.1, p. 1-18, 1982.

BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MARCON, R.; WERNER, M. F. P.; RAE, G. A.; SMIDERLE, F. R.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M.; MARQUES, M. C. A.; SANTOS, A. R. S. Antinociception of  $\beta$ -D-glucan from *Pleurotus pulmonarius* is possibly related to protein kinase C inhibition. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, p. 872-877, 2012.

BAGGIO, C.H., FREITAS, C.S., MARTINS, D.F., MAZZARDO, L., SMIDERLE, F.R., SASSAKI, G.L., IACOMINI, M., MARQUES, M.C. A., SANTOS, A.R.S. Antinociceptive effects of (1→3),(1→6)-linked- $\beta$ -glucan isolated from *Pleurotus pulmonarius* in models of acute and neuropathic pain in mice: evidence for a role for glutamatergic receptors and cytokine pathways. **The Journal of Pain**, v. 11, n. 10, p. 965-971, 2010.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D.F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. 2 ed. New York: McGraw-Hill, 1986.

BARBOSA, A. M.; CUNHA, P. D. T.; PIGATTO, M. M.; SILVA, M. L. C. Produção e aplicações de exopolissacarídeos fúngicos. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 25, n. 1, p. 29-42, 2004.

BARRETO-BERGTER, E.; FIGUEIREDO, R.T. Fungal glycans and the innate immune recognition. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.4, 145, 2014. doi: 10.3389/fcimb.2014.00145.

BEAUVAIS, A.; FONTAINE, T.; AIMANIANDA, V.; LATGÉ, JP. *Aspergillus* cell wall and biofilm. *Mycopathologia*, v. 178, p. 371-377, 2014.

BISARIA, R.; MADHAN, M. Mushrooms: potential protein source from cellulosic residues. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 5, p. 251-259, 1983.

BONATTI, M.; KARNOPP, P.; SOARES, H. M.; FURLAN, S. A. Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocellulosic wastes. **Food Chemistry**, v. 88, n. 3, p. 425-428, 2004.

BONATTI, M. **Estudo do potencial nutricional de cogumelos do gênero *Pleurotus* cultivados em resíduos agro-industriais**. 148 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

BONONI, V. L.; CAPELARI, M.; MAZIERO, R.; TRUFEM, S. F. B. **Cultivo de cogumelos comestíveis**. 2 ed., São Paulo: Cone Editora, 1999.

BORGES, G. M.; DE BARBA, F. F. M.; SCHIEBELBEIN, A. P.; PEREIRA, B. P.; CHAVES, M. B.; SILVEIRA, M. L. L.; PINHO, M. L. S.; FURLAN, S. A.; WISBECK, E.

Extracellular polysaccharide production by a strain of *Pleurotus djamor* isolated in the south of Brazil and antitumor activity on sarcoma 180. **Brazilian Journal of Microbiology**, Online, 2014a.

BORGES, F. R., SILVA, M. D., CÓRDOVA, M. M., SCHAMBACH, T. R., PIZZOLATTI, M. G., & SANTOS, A. R. Anti-inflammatory action of hydroalcoholic extract, dichloromethane fraction and steroid  $\alpha$ -spinasterol from *Polygala sabulosa* in LPS-induced peritonitis in mice. **Journal of Ethnopharmacological**, v.151, n. 1, p. 144-50, 2014b.

BREENE, W. Nutritional and medicinal value of specialty mushrooms. **Journal of Food Protection**, v. 53, n. 10, p. 883-894, 1990.

BUSWELL, J. A.; ODIER, E. Lignin Biodegradation. **Critical Review of Biotechnology**, v. 6, n.1, p. 1-60, 1987.

CARBONERO, E. R.; RUTHES, A. C.; FREITAS, C. S.; UTRILLA, P.; GALVEZ, J.; SILVA, E. V.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Chemical and biological properties of a highly branched  $\beta$ -glucan from edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, p. 814-819, 2012.

CARBONERO, E. R.; GRACHER, A. H. P.; ROSA, M. C. C.; TORRI, G.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Unusual partially 3-O-methylated  $\alpha$ -galactan from mushrooms of the genus *Pleurotus*. **Phytochemistry**, v. 69, p. 252–257, 2008.

CARBONERO, E.R.; GRACHER, A.H.P.; SMIDERLE, F.R.; ROSADO, F.R.; SASSAKI, G.L.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. A  $\beta$ -glucan from the fruit bodies of edible mushrooms *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatoroseus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, p. 252-257, 2006.

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C. **The Fungi**. 3 ed., London: Academic Press, 1996.

CASTRO, A. L. A.; PAIVA, P. C. A.; DIAS, E. S.; SANTOS, J. Avaliação das alterações bromatológicas e de degradabilidade do resíduo da lixadeira do algodão após tratamento biológico com *Pleurotus sajor-caju*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 3,



p. 608-613, 2004.

CAVAZZONI, V.; ADAMI, A. Exopolysaccharides produced by mycelial edible mushrooms. **Italian Journal of Food Science**, v. 1, p. 9-15, 1992.

CHAKRABORTY, I.; MONDAL, S.; ROUT, D.; ISLAM, S. S. A water-insoluble (1→3)- $\beta$ -D-glucan from the alkaline extract of an edible mushroom *Termitomyces eurhizus*. **Carbohydrate Research**, v. 341, p. 2990-2993, 2006.

CHANG, S. T.; MILES, P. G. Mushrooms: trends in production and technological development. **Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 41/42, p. 73-81, 1993.

CHANG, S. T.; MILES, P. G. **Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact**. 2 ed. Shu-Ting Chang: CRC Press, 2004.

CHANPUT, W.; MES, J.; VREEBURG, R. A. M.; SAVELKOUL, H. F. J.; WICHERS, H. J. Transcription profiles of LPS-stimulated THP-1 monocytes and macrophages: A tool to study inflammation modulating effects of food-derived compounds. **Food and Function**, v. 1, p. 254–261, 2010.

CHEN, L.; CHEUNG, P. C. Mushroom dietary fiber from the fruiting body of *Pleurotus tuber-regium*: fractionation and structural elucidation of nondigestible cell wall components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 13, p. 2891-2899, 2014.

CHEN, L.; XU, W.; LIN, S.; CHEUNG, P. C. K. Cell wall structure of mushroom sclerotium (*Pleurotus tuber-regium*): Part 1. Fractionation and characterization of soluble cell wall polysaccharides. **Food Hydrocolloids**, v. 36, p. 189-195, 2014a.

CHEN, L.; ZHANG, B-B.; CHEN, J-L.; CHEUNG, P. C. K. Cell wall structure of mushroom sclerotium (*Pleurotus tuber-regium*): Part 2. Fine structure of a novel alkali-soluble hyper-branched cell wall polysaccharide. **Food Hydrocolloids**, v. 38, p. 48-55, 2014b.

CHEN, J.; SEVIOUR, R. Medicinal importance of fungal  $\beta$ -(1/3), (1/6)-glucans. **Mycological Research**, v. 111, n. 6, p. 635-652, 2007.

CHEN, X.; XU, X.; ZHANG, L.; KENNEDY, J. F. Flexible chain conformation of (1→3)- $\beta$ -D-glucan from *Poria cocos* sclerotium in NaOH/urea aqueous solution. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, n. 4, p. 586–591, 2009.

CHENGHUA, D.; XIANGLIANG, Y.; XIAOMAN, G.; YAN, W.; JINGYAN, Z.; HUIBI, X. A  $\beta$ -D-glucan from the sclerotia of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Sing. **Carbohydrate Research**, v. 328, p. 629–633, 2000.

CIUCANU, I.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydrate Research**, v. 131, p. 209-217, 1984.

CONFORTIN, F. G.; MARCHETTO, R.; BETTIN, F.; CAMASSOLA, M.; SALVADOR, M.; DILLON, A. J. P. Production of *Pleurotus sajor-caju* strain PS-2001 biomass in submerged culture. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 1149-1155, 2008.

CUI, F. J., TAO, W. Y., XU, Z. H., GUO, W. J., XU, H. Y., AO, Z. H., JIN, J., WEI, Y. Q. Structural analysis of antitumor heteropolysaccharide GFPS1b from the cultured mycelia of *Grifola frondosa* GF9801. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 395–401, 2007.

CRISAN, E.V.; SANDS, A. Nutricional value. In: CHANG, S. T.; HAYES, W.A. **The biology and cultivation of edible mushrooms**. Cap. 6, p. 137-165. Academic Press: London, 1978.

CRONSTEIN, B. N.; WEISSMANN, G. Targets for antiinflammatory drugs. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 35, p. 449-62, 1995. doi: 10.1146/annurev.pa.35.040195.002313.

CRUZ-MACHADO, S. S.; Lipopolissacarídeo (LPS): ativador e regulador da transcrição gênica via fator de transcrição NF- $\kappa$ B. **Revista de Biologia da USP**, v.4, p. 40-43, 2010.

DABA, A. S.; EZERONYE, O. U. Anti-cancer effect of polysaccharides isolated from higher basidiomycetes mushrooms. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 12, p. 672-678, 2003.

DABA, A. S.; KABEIL, S. S.; BOTROS, W. A.; EL-SAADANI, M. A. Production of Mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in Egypt as a Source of Nutritional and Medicinal. **Food World Journal of Agricultural Sciences**, v. 4, n. 5, p. 630-634, 2008.

DALONSO, N., SOUZA, R., SILVEIRA, M. L. L., RUZZA, A. A., WAGNER, T. M., WISBECK, E., FURLAN, S. A. Characterization and antineoplastic effect of extracts obtained from *Pleurotus sajor caju* fruiting bodies. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 8, p. 2265-2274, 2010.

DA SILVA, M.D.; GUGINSKI, G.; WERNER, M.F.; BAGGIO, C.H.; MARCON, R.; SANTOS, A. R. Involvement of interleukin-10 in the anti-inflammatory effect of Sanyinjiao (SP6) acupuncture in a mouse model of peritonitis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, 2011- 217946, 2011.

DE BARBA, F. M.; SILVEIRA, M. L. L.; PILONI, B. U.; FURLAN, S. A.; PINHO, M. S. L. Influence of *Pleurotus djamor* bioactive substances on the survival time of mice inoculated with sarcoma 180. **International Journal of Pharmacology**, v. 7, n. 4, p. 478-484, 2011.

DEEPALAKSHMI, K.; MIRUNALINI, S. *Pleurotus ostreatus*: an oyster mushroom with nutritional and medicinal properties. **Journal of Biochemical Technology**, v. 5, n. 2, p. 718-726, 2014.

DEVI, K. S. P.; ROY, B.; PATRA, P.; SAHOO, B.; ISLAM, S. S.; MAITI, T. K. Characterization na lectin microarray of na immunomodulatory heteroglucan from *Pleurotus ostreatus* mycelia. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, p. 857-865, 2013.

DEY, B.; BHUNIA, S. K.; MAITY, K. K.; PATRA, S.; MANDAL, S.; MAITI, S.; MAITI, T. K.; SIKDAR, S. R.; ISLAM, S. S. Glucans of *Pleurotus florida* blue variant: Isolation, purification, characterization and immunological studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.50, p. 591–597, 2012.

DI ROSA, M. Biological properties of carrageenan. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 24, n. 2, p. 89–102, 1972.

DIAS, E. S.; KOSHIKUMO, E. M. S.; SCHWAN, R. F.; SILVA, R. Cultivo do Cogumelo *Pleurotus sajor-caju* em diferentes resíduos agrícolas. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 6, p. 1363-1369, 2003.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

DUFOSSÉ, L.; FOUILLAUD, M.; CARO, Y.; MAPARI, S. A. S.; SUTTHIWONG, N. Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants for the food industry. **Current Opinion In Biotechnology**, v.26, p. 56-61, 2014.

EIRA, A. F. Fungos comestíveis. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Fungos uma introdução a biologia, bioquímica e biotecnologia**. Cap.12, p. 379-448, Caxias do Sul: Educs, 2004.

EL ENSHASY, H. A.; HATTI-KAUL, R. Mushroom immunomodulators: unique molecules with unlimited applications. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 12, p. 668-677, 2013.

EL-ENSHASY, H.; DABA, A.; EL-DEMELLAWY, M.; IBRAHIM, A.; EL SAYED, S.; EL-BADRY, I. Bioprocess development for large scale production of anticancer exopolysaccharide by *Pleurotus ostreatus* in submerged culture. **Journal of Applied Sciences**, v. 10, n. 21, p. 2523-2529, 2010.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Educa, 2004.

FACCHINI, J. M.; ALVES, E. P.; AGUILERA, C.; GERN, R. M. M.; SILVEIRA, M. L. L.; WISBECK, E.; FURLAN, S. A. Antitumor activity of *Pleurotus ostreatus* polysaccharide fractions on Ehrlich tumor and sarcoma 180. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 68, p. 72-77, 2014.

FAN, L.; SOCCOL, A. T.; PANDEY, A.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R. Effect of caffeine and tannins on cultivation and fructification of *Pleurotus* on coffee husks. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 420-424, 2006.

FERREIRA, J.; TRICHÊS, K. M.; MEDEIROS, R.; CALIXTO, J. B. Mechanisms involved in the nociception produced by peripheral protein kinase c activation in mice. **Pain**, v. 117, p. 171-181, 2005.

FRIEL, M. T.; McLOUGHLIN, A. J. Production of a liquid inoculum/spawn of *Agaricus bisporus*. **Biotechnology Letters**, v. 22, p. 351-354, 2000.

FU, K. Y.; LIGHT, A. R.; MAIXNER, W. Relationship between nociceptor activity, peripheral edema, spinal microglial activation and long-term hyperalgesia induced by formalin. **Neuroscience**, v. 101, n. 4, p. 1127-1135, 2000.

FUKUDA, E. K.; VASCONCELOS, A. F. D.; MATIAS, A. C.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; SILVA, M. L. C. Polissacarídeos de parede celular fúngica: purificação e caracterização. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 1, p. 117-134, 2009.

FURLAN, S. A., VIRMOND, L. J., MIERS, D. A., BONATTI, M., GERN, R. M. M., JONAS, R. Mushrooms strains able to grow at high temperatures and low pH values. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 13, n. 6, p. 689-692, 1997.

GANTNER, B. N.; SIMMONS, R. M.; CANAVERA, S. J.; AKIRA, S.; UNDERHILL, D. M. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 197, n. 9, p. 1107-1110, 2003.

GERN, R. M. M.; WISBECK, E.; RAMPINELLI, J.; NINOW, J. L.; FURLAN, S. A. Alternative medium for production of *Pleurotus ostreatus* biomass and potential antitumor polysaccharides. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 76-82, 2008.

GIAVASIS, I. Bioactive fungal polysaccharides as potential functional ingredients in food and nutraceuticals. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 26, p. 162-173, 2014.

GOGAVEKAR, S. S.; ROKADE, S. A.; RANVEER, R. C.; GHOSH, J. S.; KALYANI, D.C.; SAHOO, A. K. Important nutritional constituents, flavor components, antioxidant and antibacterial properties. **Journal of Food Science and technology**, v. 51, n.8, p. 1483-1491, 2014.

GOODRIDGE, H. S.; WOLF, A.; UNDERHILL, D. M.  $\beta$ -glucan recognition by the innate immune system. **Immunological Reviews**, v. 230, p. 38-50, 2009.

GORIN, P. A. J., IACOMINI, M. Polysaccharides of the lichens *Cetraria islandica* and *Ramalina usnea*. **Carbohydrate Research**, v. 128, p. 119–132, 1984.

GORIN, P. A. J.; TEIXEIRA, A. Z. A.; TRAVASSOS, L. R.; LABOURIAU, M. L. S.; IACOMINI, M. Characterization of carbohydrate components of an unusual hydrogel formed by seed coats of *Magonia pubescens* (Tingui). **Carbohydrate Research**, v. 282, n. 2, p. 325-333, 1996.

GUILLAMÓN, E.; GARCIA-LAFUENTE, A.; LOZANO, M.; D'ARRIGO, M.; ROSTAGNO, M. A.; VILLARES, A.; MARTINEZ, J. A. Edible mushrooms: role in the prevention of cardiovascular diseases. **Fitoterapia**, v. 81, p. 715-723, 2010.

GUNDE-CIMERMAN, N. Medicinal value of the genus *Pleurotus* (Fr.) P. Karst. (Agaricales s.l., Basidiomycetes). **Internacional Journal of Medicinal Mushrooms**. v. 1, p. 69-80, 1999.

GUTIÉRREZ, A.; MARTÍNEZ, M. J.; ALMENDROS, G.; GONZÁLEZ-VILA, F. J.; MARTÍNEZ, A.T. Hyphal-sheath polysaccharides in fungal deterioration. **The Science of the Total Environment**, v. 167, p. 315-328, 1995.

HAY, G. W.; LEWIS, B. A.; SMITH, F. Periodate oxidation of polysaccharides: general procedures. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 5, p. 357-360, 1965.

HESELTIME, C.W. Solid state fermentation – an overview **Internacional Biodeterioration**, v. 23, p. 79-89, 1987.

HOFFMANN, G.C.; SIMSON, B.W.; TIMELL, T.E. Structure and molecular size of pachyman. **Carbohydrate Research**, v. 20, n. 1, p. 185–188, 1971.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, p. 103-114, 1987.

IM, K. H.; NGUYEN, T. K.; SHIN, D. B.; LEE, K. R.; LEE, T. S. Appraisal of antioxidant and anti-inflammatory activities of various extracts from the fruiting bodies of *Pleurotus florida*, **Molecules**, v. 19, p. 3310-3326, 2014.

JESEŇÁK, M.; MAJTAN, J.; RENNEROVA, Z.; KYSELOVIC, J.; BANOVCIN, P.; HRUBISKO, M.; Immunomodulatory effect of pleuran ( $\beta$ -glucan from *Pleurotus ostreatus*) in children with recurrent respiratory tract infections. **International Immunopharmacology**, v. 15, p. 395-399, 2013.

JESEŇÁK M.; SANISLÓ Ľ.; KUNIAKOVÁ R.; RENNEROVÁ Z.; BUCHANEC J.; BÁNOVČIN P. Immunoglucan P4H® in the prevention of recurrent respiratory infections in childhood. **Cesko-Slovenská Pediatrie**, v. 65, p. 639-647, 2010.

KALAČ, P. A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 2, p. 209–218, 2013.

KANAGASABAPATHY, G.; CHUA, K. H.; MALEK, S. N.; VIKINESWARY, S.; KUPPUSAMY, U. R. AMP-activated protein kinase mediates insulin-like and lipomobilising effects of  $\beta$ -glucan-rich polysaccharides isolated from *Pleurotus sajor-caju* (Fr.), Singer mushroom, in 3T3-L1 cells. **Food Chemistry**, v. 145, p. 198-204, 2014.

KANKKUNEN, P.; TEIRILÄ, L.; RINTAHAKA, J.; ALENIUS, H.; WOLFF, H.; MATIKAINEN, S. (1,3)- $\beta$ -Glucans activate both dectin-1 and NLRP3 inflammasome in human macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 184, p. 6335-6342, 2010.

KARÁCSONYI, S.; KUNIAK, L. Polysaccharides of *Pleurotus ostreatus*: isolation and structure of pleuran, na álcali-insoluble  $\beta$ -D-glucan. **Carbohydrate Polymers**, v. 24, p. 107-111, 1994.

KIDD, B. L.; URBAN, L. A. Mechanisms of inflammatory pain. **British Journal of Anaesthesia**, v. 87, n. 1, p. 3-11, 2001.

KIM, M-Y.; CHUNG, I-M.; LEE, S-J.; AHN, J-K.; KIM, E-H.; KIM, M-J.; KIM, S-L.; MOON, H-I.; RO, H-M.; KANG, E-Y.; SEO, S-H.; SONG, H-K. Comparative of free

amino acid, carbohydrate concentrations in Korean edible and medicinal mushrooms. **Food Chemistry**, v. 113, p. 386-393, 2009.

KOMURA, D. L.; RUTHES, A. C.; CARBONERO, E. R.; ALQUINI, G.; ROSA, M. C. C.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. The origin of mannans found in submerged culture of basidiomycetes. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 1052–1056, 2010.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; BEER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceeding**, v. 18, p. 412-416, 1959.

KOZARSKI, M. S.; KLAUS, A. S.; NIKSIC, M. P.; VAN GRIENSVEN, L. J. L. D.; VRVIC, M. M.; JAKOVLJEVIC, D. M. Polysaccharides of higher fungi: biological role, structure and antioxidante activity. **Chemical Industry**, v.68, n. 3, p. 305-320, 2014.

LAVI, I.; FRIESEM, D.; GERESH, S.; HADAR, Y.; SCHWARTZ, B. An aqueous polysaccharide extract from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* induces anti-proliferative and pro-apoptotic effects on HT-29 colon câncer cells. **Cancer Letters**, v. 244, p. 61-70, 2006.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. Animal models of nociception. **Pharmacological Reviews**, v. 53, n. 4, p. 597-652, 2001.

LI, N.; LI, L.; FANG, J. C.; WONG, J. H.; NG, T. B.; JIANG, Y.; WANG, C. R.; ZHANG, N. Y.; WEN, T. Y.; QU, L. Y.; LV, P. Y.; ZHAO, R.; SHI, B.; WANG, Y. P.; WANG, X. Y.; LIU, F. Isolation and identification of a novel polysaccharide-peptide complex with antioxidant, antiproliferative and hypoglycaemic activities from the *Abalone* mushroom. **Bioscience Reports**, v. 32, p. 221-228, 2012.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimaticos. Vol. 3. Sao Paulo: Edgard Blücher, 2001.

LINDEQUIST, U., NIEDERMEYER, T. H. J., JULICH, W. D. The pharmacological potentials of mushrooms. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, p. 285-299, 2005.



LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-CT method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LIU, J.; SUN, Y.; YU, H.; ZHANG, C.; YUE, L.; YANG, X.; WANG, L.; LIU, J. Purification and identification of one glucan from golden oyster mushroom (*Pleurotus citrinopileatus* (Fr.) Singer). **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 348-352, 2012.

LORENZEN, K.; ANKE, T. Basidiomycetes as a source for new bioactive natural products. **Current Organic Chemistry**, v. 2, p. 329-364, 1998.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10 ed., São Paulo: Prentice Hall, 2004.

MANTOVANI, M.S.; BELLINI, M.F.; ANGELI, J.P.F.; OLIVEIRA, R.J.; SILVA, A.F.; RIBEIRO, L.R.  $\beta$ -Glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer. **Mutation Research**, v. 658, p. 154-161, 2008.

MANZI, P.; PIZZOFERRATO, L. Beta-glucans in edible mushrooms. **Food Chemistry**, v. 68, p. 315-318, 2000.

MARTIN, A. M. Study of the growth and biomass composition of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*. **Food Science and Human Nutrition**, p. 239-248, 1992.

MODA, E. M.; HORII, J.; SPOTO, M. H. F. Edible mushroom *Pleurotus sajor-caju* production on washed and supplemented sugarcane bagasse. **Scientia Agricola**, v. 62, n. 2, p. 127-132, 2005.

MOONMOON, M.; UDDIN, N. AHMED, S. SHELLY, N. J.; KHAN, A. Cultivation of different strains of king oyster mushroom (*Pleurotus eryngii*) on saw dust and rice straw in Bangladesh. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 17, n. 4, p. 341-345, 2010.

MORADALI, M. F.; MOSTAFAVI, H.; GHODS, S.; HEDJAROUDE, G. A. Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi). **International Immunopharmacology**, v. 7, p. 701-724, 2007.

NELSON D.L.; COX M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**, 5 ed., Porto Alegre: Artmed, 2011.

NI, J.; MCLOUGHLIN, R. M.; BRODOVITCH, A.; MOULIN, P.; BROUCKAERT, P.; CASADEI, B.; FERON, O.; TOPLEY, N.; BALLIGAND, J. L.; DEVUYST, O. Nitric oxide synthase isoforms play distinct roles during acute peritonitis. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 25, n. 1, p. 86-96, 2010.

NITSCHKEA, J.; ALTENBACHB, H. J.; MALOLEPSZYA, T.; MÖLLEKENA, H. A new method for the quantification of chitin and chitosan in edible mushrooms. **Carbohydrate Research**, v. 346, n. 11, p. 1307–1310, 2011.

NOSÁL'OVÁ, V.; BOBEK, P.; CERNÁ, S.; GALBAVÝ, S.; STVRTINA, S. Effects of pleuran ( $\beta$ -glucan isolated from *Pleurotus ostreatus*) on experimental colitis in rats. **Physiological Research**, v. 50, p. 575-581, 2001.

OLIVEIRA, M. A.; DONEGA, M. A.; PERALTA, R. M.; SOUZA, C. G. M. Produção do inóculo do cogumelo comestível *Pleurotus pulmonaris* (Fr.) Quélet – CCB19 a partir de resíduos da agroindústria. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 84-87, 2007.

OOI, V. E. C.; LIU, F. Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. **Current Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 7, p. 715-729, 2000.

ORTEGA, G. M.; MARTÍNEZ, E. O.; BETANCOURT, D.; GONZÁLEZ, A. E.; OTERO, M. A. Bioconversion of sugar cane crop residues with white-rot fungi *Pleurotus* sp. **World of Microbiology and Biotechnology**, v.8, p. 402-405, 1992.

OSENI, T. O.; DLAMINI, S. O.; EARNSHAW, D. M.; MASARIRAMBI, M. T. Effect of substrate pre-treatment methods on oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) production. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 14, n. 2, p. 251-255, 2012.

PALACIOS, I.; GARCÍA-LAFUENTE, A.; GUILLAMÓN, E.; VILLARES, A. Novel isolation of water-soluble polysaccharides from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus* mushrooms. **Carbohydrate Research**, v. 358, p. 72–77, 2012.

PATEL, Y.; NARAIAN, R.; SINGH, V. K. Medicinal properties of *Pleurotus* species (oyster mushroom): a review. **World Journal of Fungal and Plant Biology**, v. 3, n. 1, p. 01-12, 2012.

PRAMANIK, M.; MONDAL, S.; CHAKRABORTY, I.; ROUT, D.; ISLAM, S. S. Structural investigation of a polysaccharide (Fr. II) isolated from the aqueous extract of an edible mushroom, *Pleurotus sajor-caju*. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 629–636, 2005.

PRESCOTT, L. M.; HARLEY, J. P.; KLEIN, D. A. **Microbiology**. 5 ed., New York: McGraw–Hill, 2002.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. **Os reinos dos fungos**. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 1998.

QUEIROZ, S. L.; BATISTA, A. A. Funções biológicas do óxido nítrico. **Química Nova**, v.22, n.4, p. 584-590, 1999. doi 10.1590/S0100-40421999000400017.

RAJARATHNAM, S.; SHASHIREKHA, M. N.; BANO, Z. Biodegradative and biosynthetic capacities of mushrooms: present and future strategies. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 18, n. 2/3, p. 91-236, 1998.

RAMALINGAM, C.; PRIYA, J.; MUNDRA, S. Applications of microbial polysaccharides in food industry. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 27, n. 1, p. 322-324, 2014.

RAMPINELLI, J. R.; SILVEIRA, M. L. L.; GERN, R. M. M.; FURLAN, S. A.; NINOW, J. L.; WISBECK, E. Valor nutricional de *Pleurotus djamor* cultivado em palha de bananeira. **Alimentos e Nutrição**, v. 21, n. 2, p. 197-202, 2010.

RASHAD, M. M.; ABDOU, H. M.; MAHMOUD, A. E.; NOOMAN, M. U. Nutritional analysis and enzyme activities of *Pleurotus ostreatus* cultivated on citrus limonium and carica papaya wastes. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 3, n.4, p. 3352-3360, 2009.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHEHORNS, S. E. **Biologia Vegetal**. 7 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

REIS, F. S.; BARROS, L.; MARTINS, A.; FERREIRA, I. C. F. R. Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: an inter-species comparative study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 191-197, 2012.

ROSADO, F. R.; GERMANO, S.; CARBONERO, E. R.; DA COSTA, S. M.; IACOMINI, M.; KEMMELMEIER, C. Biomass and exopolysaccharide production in submerged cultures of *Pleurotus ostreatus* Sing. and *Pleurotus ostreatus* "florida" (Jack.:Fr.)Kummer. **Journal of Basic Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 230-237, 2003.

ROSADO, F. R.; CARBONERO, E. R.; KEMMELMEIER, C.; TISCHER, C. A.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. A partially 3-O-methylated (1→4)-linked  $\alpha$ -D-galactan and  $\alpha$ -D-mannan from *Pleurotus ostreatus* Sing. **FEMS Microbiology Letters**, v. 212, p. 261-265, 2002.

ROUPAS, P.; KEOGH, J.; NOAKES, M.; MARGETTS, C.; TAYLOR, P. The role of edible mushrooms in health: evaluation of the evidence. **Journal of Functional Foods**, v.4, p. 687-709, 2012

RUTHES, A. C.; SMIDERLE, F. R.; IACOMINI, M. D-Glucans from edible mushrooms: a review on the extraction, purification and chemical characterization approaches. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 753-761, 2015.

SATITMANWIWAT, S.; RATANAKHANOKCHAI, K.; LAOHAKUNJIT, N.; PASON, P.; TACHAAPAUKOON, C.; KYU, K. L. Purification and partial characterization of an acid  $\alpha$ -glucan-protein complex from the fruiting body of *Pleurotus sajor-caju* and its effect on macrophage activation. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 76, n. 10, p. 120371-120377, 2012.

SANTOS-NEVES, J. C.; PEREIRA, M. I.; CARBONERO, E. R.; GRACHER, A. H. P.; ALQUINI, G.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. A novel branched  $\alpha\beta$ -glucan isolated from the basidiocarps of the edible mushroom *Pleurotus florida*. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, p. 309–314, 2008a.

SANTOS-NEVES, J. C.; PEREIRA, M. I.; CARBONERO, E. R.; GRACHER, A. H. P.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. A gel-forming  $\beta$ -glucan isolated from

the fruit bodies of the edible mushroom *Pleurotus florida*. **Carbohydrate Research**, v.343, p.1456–1462, 2008b.

SANTOS-OLIVEIRA, J. R.; REGIS, E. G.; LEAL, C. R. B.; CUNHA, R. V.; BOZZA, P. T.; DA-CRUZ, A. M. Evidence that lipopolysaccharide may contribute to the cytokine storm and cellular activation in patients with visceral leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n.7, e1198, 2011. doi:10.1371/journal.pntd.0001198.

SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; SOUZA, L. M.; CZELUSNIAK, P. A.; IACOMINI, M. Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards for GC-MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 731-739, 2005a.

SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J. Methylation-GC-MS analysis of arabinofuranose- and galactofuranose-containing structures: rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 77, n. 2, p. 223-234, 2005b.

SCHEPETKIN, I. A.; QUINN, M. T. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potencial. **International Immunopharmacology**, v.6, p. 317-333, 2006.

SHEN, J. W.; SHI, C. W.; XU, C. P. Exopolysaccharides from *Pleurotus pulmonarius*: fermentation optimization, characterization and antioxidante activity. **Food Technology Biotechnology**, v. 51, n. 4, p. 520-527, 2013.

SILVA, R. R.; COELHO, G. D. **Fungos**: Principais grupos e aplicações biotecnológicas. Curso de capacitação de monitores e educadores. Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente. São Paulo, 2006.

SILVEIRA, M. L. L.; FURLAN, S. A.; NINOW, J. L. Development of an alternative technology for the oyster mushroom production using liquid inoculum. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 4, p. 858-862, 2008.

SMIDERLE, F. R.; RUTHES, A. C.; IACOMINI, M. Natural polysaccharides from mushrooms: antinociceptive and anti-inflammatory properties. p. 1-25. In: MÉRILLON,

J. M.; RAMAWAT, K. G. **Bioactivity and biotechnology**. Heidelberg: Springer-Verlag, 2014.

SMIDERLE, F. R.; ALQUINI, G.; TADRA-SFEIR, M. Z.; IACOMINI, M.; WICHES, H. J.; VAN GRIENSVEN, L. J. L. D. *Agaricus bisporus* and *Agaricus brasiliensis* (1→6)- $\beta$ -D-glucans show immunostimulatory activity on human THP-1 derived macrophages. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, p. 91–99, 2013.

SMIDERLE, F. R.; OLSEN, L. M.; RUTHES, A. C. CZELUSNIAK, P. A.; SANTANA-FILHO, A. P.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Exopolysaccharides, proteins and lipids in *Pleurotus pulmonarius* submerged culture using different carbon sources. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 368-376, 2012.

SMIDERLE, F.R.; OLSEN, L.M.; CARBONERO, E.R.; BAGGIO, C.H.; FREITAS, C.S.; MARCON, R.; SANTOS, A.R.S.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Anti-inflammatory and analgesic properties in a rodent model of a (1→3),(1→6)-linked  $\beta$ -glucan isolated from *Pleurotus pulmonarius*. **European Journal of Pharmacology**, v. 597, p. 86–91, 2008a.

SMIDERLE, F.R.; OLSEN, L.M.; CARBONERO, E.R.; MARCON R.; BAGGIO, C.H.; FREITAS, C.S.; SANTOS, A.R.S.; TORRI, G.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. A 3-O-methylated mannogalactan from *Pleurotus pulmonarius*: Structure and antinociceptive effect. **Phytochemistry**, v. 69, p. 2731–2736, 2008b.

SUN, Y.; LIU, J. Purification, structure and immunobiological activity of a water-soluble polysaccharide from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus*. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 983-986, 2009.

SUSEEM, S. R.; MARY SARAL, A.; NEELAKANDA, R. P.; MARSLIN, G. Evaluation of the analgesic activity of ethyl acetate, methanol and aqueous extracts of *Pleurotus* mushroom. **Asian Pacific Journal of tropical Medicine**, p. 117-120, 2011.

SUTHERLAND, I.W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 41-46, 1998.

SYED, S. H.; NAMDEO, A. G. Current status of natural products for the treatment of liver disease – A review. **International Journal of Phytopharmacy**, v. 4, n. 2, p. 37-43, 2014

SYNYTSYA, A.; MICĀKOVA, K.; SYNYTSYA, A.; JABLONSKY', I.; SPEĀVACĀEK, J.; ERBAN, V.; KOVARĀIKOVA, E.; CĀOPIKOVA, J. Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. **Carbohydrate Polymers**, v.76, p.548–556, 2009.

TJØLSEN, A.; HOLE, K. Animal models of analgesia. In: A. DICKENSON, J.M. BESSON (Eds.) **The Pharmacology of Pain**, Springer Verlag, Berlin, pp. 1-20, 1997.

TJØLSEN, A.; BERGE, O.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J. H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v. 51, n. 1, p. 5-17, 1992.

TONG, H.; XIA, F.; FENG, K.; SUN, G.; GAO, X.; SUN, L.; JIANG, R.; TIAN, D.; SUN, X. Structural characterization and *in vitro* antitumoral activity of a novel polysaccharide isolated from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus*. **Bioresource Tecnology**, v. 100, p. 1682-1686, 2009.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8 ed., Porto Alegre: Atmed, 2005.

URBEN, A. F.; OLIVEIRA, C. Cogumelos comestíveis: utilização e fontes genéticas. In: LUZ, W. C.; FERNANDES, J. M.; PRESTES, A. M.; PICININI, E. C. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. 6 ed., Passo Fundo: Padre Berthier dos Missionários da Sagrada Família, 1998.

VALE, F. M. Dor. Novos aspectos fisiopatológicos e consequentes estratégias farmacológicas. **RFML**, v. 3, n. 5, p. 291-304, 2003.

VEGA, K.; KALKUM, M. Chitin, chitinase reponses, and invasive fungal infections. **International Journal of Microbiology**, v. ID 920459, 10 pages, 2012. doi 10.1155/2012/920459.

WAINWRIGHT, M. **An introduction to fungal biotechnology**. Nova Jersey: John Wiley and Sons, 1992.

WALKER, G. M.; WHITE, N. A. Introduction to fungal physiology. In: KAVANAGH, K. **Fungi: biology and applications**. Nova Jersey: John Wiley and Sons, p. 1-34, 2005.

WANG, J.; WU, C.; CHEN, Y.; CHEN, C.; HU, S.; CHANG, S. Antihyperglycemic activity of exopolysaccharide produced by mushroom *Pleurotus ferulae* with submerged liquid culture on streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 2, n. 7, p. 419-424, 2014.

WANG, J.; ZHANG, L. Structure and chain conformation of five water-soluble derivatives of a  $\beta$ -D-glucan isolated from *Ganoderma lucidum*. **Carbohydrate Research**, v. 344, n. 1, p. 105–112, 2009.

WASSER, S. P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, p. 258-274, 2002.

WASSER, S. P. Medicinal mushroom science: current perspectives, advances, evidences, and challenges. **Biomedical Journal**, v. 37, n. 6, p. 345-356, 2015. doi: 10.4103/2319-4170.138318

WEBSTER, J.; WEBER, R. **Introduction to Fungi**. 3 ed,. Nova York: Cambridge University Press, 2007.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenin induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 111, n. 1, p. 544-547, 1962.

WISBECK, E. **Estudo do cultivo submerso de *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 para a produção de biomassa e exopolissacarídeos**. 175 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2003.

WOESE, C. R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M. L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. **PNAS**, v. 87, n. 12, p. 4576-4579, 1990.



WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. In: WHISTLER, R. L.; WOLFROM, M. L.; BE MILLER, J. N. (eds.). **Methods Carbohydrate Chemistry**, v. 2, p. 211-215, 1963a.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. In: WHISTLER, R. L.; WOLFROM, M. L.; BE MILLER, J. N. (eds.). **Methods Carbohydrate Chemistry**, v. 2, p. 65-67, 1963b.

WU, G-H.; LU, C-L.; JIANG, J-G.; LI, Z-Y.; HUANG, Z-L. Regulation effect of polysaccharides from *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) on the imune activity of mice macrophages. **Food and Function**, v. 5, p. 337-344, 2014.

YANG, Z.; XU, J.; FU, Q.; FU, X.; SHU, T.; BI, Y.; SONG, B. Antitumor activity of a polysaccharide from *Pleurotus eryngii* on a mice bearing renal câncer. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, p. 625-620, 2013.

YANG, Q. I.; HUANG, B. O.; LI, H.; ZHANG, C.; ZHANG, R.; HUANG, Y.; WANG, J. Gastroprotective activities of a polysaccharide from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus* in rats. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 5, p. 1224–1228, 2012.

YILDIZ, A.; KARAKAPLAN, M.; AYDIN, F. Studies on *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex. Fr.) Kum. var. *salignus* (Pers. ex Fr.) Konr. et Maubl.: cultivation, proximate composition, organics and mineral composition of carpophores. **Food Chemistry**, v. 61, n. 1/2, p. 127-130, 1998.

YOSHIOKA, Y.; TABETA, R.; SAITO, H.; UEHARA, N.; FUKUOKA, F. Antitumor polysaccharides from *Pleurotus ostreatus* (Fr.) QUÉL: isolation and structure of a  $\beta$ -glucan. **Carbohydrate Research**, v. 140, p. 93-100, 1985.

ZADRAZIL, F.; REINIGER, P. **Treatment of lignocellulosics with white rot fungi**. London: Elsevier Applied Science Publishers Ltda, p. 77-89, 1988.

ZADRAZIL, F., KURTZMAN, J. R. H. The biology of *Pleurotus* cultivation in the tropics. In: CHANG, S. T., QUIMIO, T. H. **Tropical Mushrooms**. Hong Kong, The Chinese Univ. Press., p. 277-278, 1984.

ZHANG, L., ZHANG, M., DONG, J., GUO, J., SONG, Y., CHEUNG, P. C. K. Chemical structure and chain conformation of the water-insoluble glucan isolated from *Pleurotus tuber-regium*. **Biopolymers**, v. 59, p. 451–457, 2001.

ZHANG, M.; CHEUNG, P. C. K.; ZHANG, L.; CHIU, C-M.; OOI, V. E. C. Carboxymethylated  $\beta$ -glucans from mushroom sclerotium of *Pleurotus tuber-regium* as novel water-soluble anti-tumor agent. **Carbohydrate Polymers**, v. 57, p. 319-325, 2004a.

ZHANG, M.; ZHANG, L.; CHEUNG, P. C. K.; OOI, V. E. C. Molecular weight and anti-tumor activity of the water-soluble polysaccharides isolated by hot water and ultrasonic treatment from the sclerotia and mycelia of *Pleurotus tuber-regium*. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, p. 123–128, 2004b.

ZHANG, A.; ZHANG, Y.; YANG, J.; SUN, P. Structural elucidation of a novel heteropolysaccharide from the fruiting bodies of *Pleurotus eyngii*. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 2239-2244, 2013a.

ZHANG, A.; XU, M.; FU, L.; SUN, P. Structural elucidation of a novel mannogalactan isolated from the fruiting bodies fo *Pleurotus geesteranus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 236-240, 2013b.

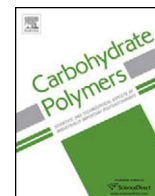
Para os que acompanharam a jornada desejo as bênção de Deus:

“O Senhor te abençoe e te guarde. O Senhor  
faça resplandecer o seu rosto sobre ti e tenha  
misericórdia de ti. O Senhor sobre ti levante o  
seu rosto e te dê a paz.

*(Benção, Bíblia Sagrada.*

*Igreja Evangélica Luterana do Brasil)*

## ANEXOS



# Structural characterization and anti-inflammatory activity of a linear $\beta$ -D-glucan isolated from *Pleurotus sajor-caju*



Marcia L.L. Silveira<sup>a,b</sup>, Fhernanda R. Smiderle<sup>a</sup>, Carla Porto Moraes<sup>b</sup>, Débora G. Borato<sup>c</sup>, Cristiane H. Baggio<sup>c</sup>, Andrea Caroline Ruthes<sup>a</sup>, Elisabeth Wisbeck<sup>b</sup>, Guilherme L. Sassaki<sup>a</sup>, Thales R. Cipriani<sup>a</sup>, Sandra A. Furlan<sup>b</sup>, Marcello Iacomini<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, CP 19046, 81531-980 Curitiba, PR, Brazil

<sup>b</sup> Universidade da Região de Joinville, CEP 89219-710 Joinville, SC, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Paraná, CP 19031, 81531-980 Curitiba, PR, Brazil

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 14 May 2014

Received in revised form 21 July 2014

Accepted 24 July 2014

Available online 2 August 2014

### Keywords:

Edible mushroom

*Pleurotus sajor-caju*

$\beta$ -D-glucan

Fruiting bodies

Anti-inflammatory activity

## ABSTRACT

Glucans comprise an important class of polysaccharides present in basidiomycetes with potential biological activities. A (1  $\rightarrow$  3)- $\beta$ -D-glucan was isolated from *Pleurotus sajor-caju* via extraction with hot water followed by fractionation by freeze-thawing and finally by dimethyl sulfoxide extraction. The purified polysaccharide showed a <sup>13</sup>C-NMR spectrum with six signals consisting of a linear glucan with a  $\beta$ -anomeric signal at 102.8 ppm and a signal at 86.1 ppm relative to O-3 substitution. The other signals at 76.2, 72.9, 68.3, and 60.8 ppm were attributed to C5, C2, C4, and C6, respectively. This structure was confirmed by methylation analysis, and HSQC studies. The  $\beta$ -D-glucan from *P. sajor-caju* presented an immunomodulatory activity on THP-1 macrophages, inhibited the inflammatory phase of nociception induced by formalin in mice, and reduced the number of total leukocytes and myeloperoxidase levels induced by LPS. Taken together, these results demonstrate that this  $\beta$ -D-glucan exhibits a significant anti-inflammatory activity.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Mushrooms of the genus *Pleurotus* are edible and must be one of the most cultivated genera in several countries because of their high adaptability. The annual production of these species reaches more than 900,000 t (Synytsya et al., 2009).

Besides their culinary importance, mushrooms have been appreciated by their medicinal properties and they have been used for different health care purposes, especially in the oriental countries (Chen & Seviour, 2007; El Enshasy & Hatti-Kaul, 2013; Zhang, Cui, Cheung, & Wang, 2007). One class of molecules that are in evidence are the polysaccharides that have emerged as important biologically active polymers (Synytsya & Novák, 2013). Basidiomycete polysaccharides have been showed to modulate the immune system, and to inhibit tumor growth, inflammation, nociception and other health problems (Chen & Seviour, 2007; Smiderle et al., 2008; Dalonso et al., 2010; Maji et al., 2012; Kanagasabapathy, Chua, Malek, Vikineswary, & Kuppusamy, 2014).

The mechanisms by which the mushroom polysaccharides exhibit their bioactivities are still unknown, although some authors have showed that these molecules can bind to immune cell receptors, and initiate immune reactions, as the production of pro- and anti-inflammatory cytokines (Chen & Seviour, 2007; El Enshasy & Hatti-Kaul, 2013). The affinity ligand-receptor depends mainly on the chemical structure of the ligand, that can be determined by its chemical formulae, conformation, and molecular weight (Zhang et al., 2007). Mushroom polysaccharides vary greatly on these three characteristics, and some studies have shown that different polysaccharide structures may exhibit different biological effects. However, the research data presented up to now are not enough to determine which molecule is responsible for each bioactivity. Therefore, the therapeutic application of a polysaccharide requires the careful knowledge of its chemical structure (El Enshasy & Hatti-Kaul, 2013).

The branched (1  $\rightarrow$  3), (1  $\rightarrow$  6)-linked  $\beta$ -D-glucans, similar to lentinan are the most common homopolysaccharides present in Basidiomycetes (Maji et al., 2012; Palacios, García-Lafuente, Guíllamón, & Villares, 2012; Smiderle et al., 2008; Carbonero et al., 2006; Santos-Neves et al., 2008). The lentinan was firstly isolated from *Lentinus edodes* and has attracted much attention because of

\* Corresponding author. Tel.: +55 41 3361 1655; fax: +55 41 3266 2042.  
E-mail address: [iacomini@ufpr.br](mailto:iacomini@ufpr.br) (M. Iacomini).

its pronounced anti-tumor activity, which is probably related to the activation of T-cells, natural-killer cells, and macrophages (Zhang, Li, Wang, Zhang, & Cheung, 2011).

Besides branched lentinan-type polysaccharides, linear glucans have also been isolated from Basidiomycetes. As example, it can be mentioned linear  $\alpha$ -D-glucans (1  $\rightarrow$  3)-linked (from *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*), or (1  $\rightarrow$  4)-linked (from *Agaricus blazei* and *P. ostreatus*) (Synytsya & Novák, 2013; Palacios et al., 2012), and (1  $\rightarrow$  6)- $\beta$ -D-glucan (from *Agaricus bisporus* and *Agaricus brasiliensis*) (Smiderle et al., 2013).

In this study, a linear (1  $\rightarrow$  3)- $\beta$ -D-glucan was isolated, for the first time, from *Pleurotus sajor-caju*. We have not found any studies showing the presence of this polysaccharide in other *Pleurotus* species. It was chemically characterized, and its biological properties were evaluated *in vitro*, using THP-1 macrophages, and *in vivo*, through formalin and peritonitis tests in mice.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Microorganisms and maintenance

*P. sajor-caju* CCB019 was obtained from the Center for Basidiomycete Cultivation of the São Paulo University, Brazil, and maintained in Petri dishes containing WDA (1 L of wheat extract, 20 g of dextrose, and 15 g of agar) at 4 °C (Furlan et al., 1997).

### 2.2. Cultivation conditions of the fruiting bodies

*P. sajor-caju* fruiting bodies cultivation was conducted at the Biotechnology Laboratory of UNIVILLE University, Joinville (SC) Brazil, using banana straw.

Banana straw was packed in polypropylene bags, supplemented with rice bran, sterilized, and inoculated using 10% solid inoculum. The first step of the process, the mycelial growth, was carried out at 25 °C, with 60% relative air humidity, artificial light, for 20 days. The induction of the fruiting body formation (second step) was achieved by perforating the plastic bags to increase air exchange, and by exposing them to light for a period of 12 h a day while increasing relative air humidity to 90%. After 20 days, the fruiting bodies were harvested, frozen, and freeze-dried.

### 2.3. Extraction and purification of the polysaccharide

Fruiting bodies were milled in a blender and the powder was defatted by addition of a chloroform–methanol (2:1 v/v) mixture at 50 °C for 24 h. Then, the residue was submitted to successive aqueous extraction at 100 °C for 24 h (10 $\times$ , 800 mL each). The hot-water extract (HW) was centrifuged (6000 rpm, 30 min, 10 °C) and reduced to a small volume, by concentration under reduced pressure in a rotary-evaporator, and the polysaccharides were recovered from this extract by precipitation with excess of ethanol (4 volume). The precipitated polysaccharides were then dialyzed against tap water for 24 h (2 kDa MWCO membrane), concentrated under reduced pressure, and submitted to freeze-thawing process. The insoluble fraction (PHW) obtained from freeze-thawing was recovered by centrifugation (12,000 rpm, 30 min, 5 °C), and submitted to one extraction with 50 mL dimethyl sulfoxide (Me<sub>2</sub>SO; 80 °C for 5 h). The Me<sub>2</sub>SO-extract (M-PHW) was dialyzed against tap water for 24 h (2 kDa MWCO membrane) and then resubmitted to the freeze-thawing process, giving rise to a water-insoluble fraction (G-PHW) recovered by centrifugation (12,000 rpm, 30 min, 5 °C). The chemical structure of this fraction was evaluated as well as its antinociceptive and anti-inflammatory activities.

### 2.4. Monosaccharide analysis

The monosaccharide composition was determined after total acid hydrolysis of a polysaccharide sample (~1 mg) with 1 M TFA at 100 °C for 12 h. The remaining acid was evaporated to dryness, and the hydrolysis product was submitted to reduction with NaBH<sub>4</sub> (Wolf from & Thompson, 1963b) and acetylation with Ac<sub>2</sub>O-pyridine (1:1, v/v; 300  $\mu$ L) for 12 h at room temperature (Wolf from & Thompson, 1963a). The resulting alditol acetates were analyzed by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) using a Varian Saturn 2000R-3800 gas chromatograph coupled to a Varian Ion-Trap 2000R mass spectrometer with He as the carrier gas. A DB-225 capillary column (30 m  $\times$  0.25 mm i.d.), which was maintained at 50 °C during injection and then programmed to increase to 220 °C at a rate of 40 °C min<sup>−1</sup>, was used for the quantitative analysis of the alditol acetates (Ruthes et al., 2013). The products were identified by their typical retention times and electron impact profiles.

### 2.5. Methylation analysis of the polysaccharide

The isolated polysaccharide was per-*O*-methylated according to the method described by Ciucanu and Kerek (1984), with slight modifications. The sample (10 mg) was dissolved in Me<sub>2</sub>SO (0.5 mL), followed by addition of iodomethane (0.5 mL), and powdered NaOH (200 mg). After vigorous stirring for 30 min, the mixture was maintained overnight at room temperature. The reaction was interrupted by the addition of water, neutralized with HOAc, dialyzed against distilled water (2 kDa MWCO membrane) and freeze-dried. The product was submitted to one more cycle of methylation, however in the second cycle, after neutralization with HOAc, the per-*O*-methylated polysaccharide was recovered by partition between CHCl<sub>3</sub> and water. The per-*O*-methylated derivatives were hydrolyzed with 45% (v/v) formic acid (HCO<sub>2</sub>H; 1 mL) at 100 °C for 15 h, followed by evaporation to dryness. The resulting mixture of *O*-methylated monosaccharides was reduced with NaBH<sub>4</sub> and acetylated with Ac<sub>2</sub>O-pyridine (1:1, v/v; 300  $\mu$ L) for 12 h at room temperature to obtain a mixture of *O*-methyl-alditol acetates. These derivatives were analyzed by GC–MS using the same conditions as described for alditol acetates (Section 2.4), with the exception that the final temperature was 215 °C. The derivatives were identified by their typical retention times and electron impact spectra (Sasaki, Gorin, Souza, Czelusniak, & Iacomini, 2005).

### 2.6. Nuclear magnetic resonance spectroscopy

The NMR spectra mono-(<sup>13</sup>C) and bidimensional (HSQC) were obtained using a 400-MHz Bruker Avance III spectrometer with a 5 mm inverse probe. The <sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz) and <sup>1</sup>H-NMR (400.13 MHz) analyses were performed at 70 °C, and the samples were dissolved in D<sub>2</sub>O or Me<sub>2</sub>SO-*d*<sub>6</sub>. The chemical shifts are expressed in ppm ( $\delta$ ) relative acetone (for samples in D<sub>2</sub>O) at  $\delta$  30.2 and  $\delta$  2.22 or to Me<sub>2</sub>SO-*d*<sub>6</sub> at  $\delta$  39.7 and  $\delta$  2.40 for <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H signals, respectively.

### 2.7. Homogeneity and average molecular mass (*M<sub>w</sub>*) analysis

The homogeneity and average molecular mass (*M<sub>w</sub>*) of the  $\beta$ -D-glucan were determined by high-performance size-exclusion chromatography (HPSEC) coupled to refractive index and multi-angle laser light-scattering detectors (MALLS). Four gel-permeation Ultrahydrogel columns, with exclusion sizes of 7  $\times$  10<sup>6</sup>, 4  $\times$  10<sup>5</sup>, 8  $\times$  10<sup>4</sup>, and 5  $\times$  10<sup>3</sup> Da, were used in series. The eluent was 0.1 M aq. NaNO<sub>2</sub> containing 200 ppm aq. NaN<sub>3</sub> at 0.6 mL min<sup>−1</sup>. The sample was dissolved in the same solution used as eluent at a concentration of 1 mg mL<sup>−1</sup>, filtered through a membrane (0.22  $\mu$ m), and injected

using a 100  $\mu\text{L}$  loop. The specific refractive index increment ( $dn/dc$ ) was determined, and the results were processed with software provided by the manufacturer (ASTRA 4.70.07, Wyatt Technologies).

## 2.8. Cell culture

The human monocytic cell line THP-1 (Rio de Janeiro Cell Bank, Rio de Janeiro, Brazil) was grown in RPMI 1640 culture medium (Sigma–Aldrich, cat. R8758) supplemented with 10% heat-treated newborn calf serum (Gibco, cat. 161010159) and penicillin/streptomycin ( $100\text{ U mL}^{-1}$ ;  $100\text{ g mL}^{-1}$ , respectively) (Sigma–Aldrich), at  $37^\circ\text{C}$  in 5%  $\text{CO}_2$  in a humidified incubator. The medium was renewed twice a week.

## 2.9. Macrophage differentiation and stimulation

The mature macrophage-like state was induced by treating THP-1 monocytes ( $500,000\text{ cells mL}^{-1}$ ) for 48 h with  $30\text{ ng mL}^{-1}$  phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; Sigma–Aldrich) in 24-wells polystyrene tissue culture plates (Costar) with 1 mL cell suspension in each well. The medium was then removed and replaced by fresh medium containing the isolated  $\beta$ -D-glucan (G-PHW) at 10, 50, and  $250\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ ; phosphate buffered saline (PBS;  $50\text{ }\mu\text{L}$ ), or lipopolysaccharide (LPS;  $1\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ ) as negative and pro-inflammatory controls, respectively. Cells were harvested at 0 h, 3 h, and 6 h after addition of treatment and kept in lysis buffer at  $-20^\circ\text{C}$  for the next step. Time point 0 h was used to normalize the calculations. All experiments were performed with the same amount of cells ( $0.5 \times 10^6$  per mL). Total RNA was isolated from the cells as follows.

## 2.10. Gene expression kinetics by real-time PCR

Total RNA was isolated by using RNeasy mini kit (Qiagen, USA) with a RNase-free DNase (Qiagen) treatment for 15 min according to the manufacturer's instructions. Complementary DNA (cDNA) was synthesized from isolated RNA ( $1\text{ }\mu\text{g}$ ) with High Capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems, USA). Expression levels of each gene were measured in triplicate reactions, performed with the same cDNA pool (1:5 diluted), in the presence of the fluorescent dye (iQ SYBR Green Supermix) using a StepOne Plus<sup>TM</sup> instrument (Applied Biosystems, USA). The experiments were performed in a  $20\text{ }\mu\text{L}$  reaction volume with specific primer pairs (Chanput, Mes, Vreeburg, Savelkoul, & Wichers, 2010), and the conditions of real-time quantitative PCR were performed as follows: denaturation at  $95^\circ\text{C}$  for 10 min and amplification by cycling 40 times at  $95^\circ\text{C}$  for 15 s and  $60^\circ\text{C}$  for 60 s. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), actin (ACTB), and  $\beta$ -2-microglobulin were used as endogenous controls, and GAPDH was chosen for normalization. The PCR of all products were subjected to a melting curve analysis to verify the single amplification product. The relative messenger RNA (mRNA) expression was presented as described in Chanput et al. (2010): values were expressed as fold change relative to the value at time point zero, calculated as  $\Delta\Delta\text{Ct}$  [ $\Delta\Delta\text{Ct} = 2(\text{Ct}_{\text{GAPDH}} - \text{Ct}_{\text{Sample}})$ ] (Livak & Schmittgen, 2001). The q-PCR analyses were performed twice on each sample (in triplicate), to evaluate the mRNA expression level of pro-inflammatory cytokine genes IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  and also the inflammation-related enzyme COX-2.

## 2.11. Experimental animals

Experiments were conducted using female Swiss mice (25–35 g), provided by the Federal University of Paraná colony. The animals were kept under standard laboratory conditions (12 h

light/dark cycles, temperature  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) with food and water provided *ad libitum*. The animals were acclimatized to the laboratory for at least 12 h before testing and were used only once for experiments. All the experiments were performed after approval of the respective protocols by the Committee of Animal Experimentation of Federal University of Paraná (CEUA/BIO–UFPR; approval number 657). The study was conducted in accordance with the “Principles of Laboratory Animal Care” (NIH Publication 85–23, revised 1985) and with the ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals (Zimmermann, 1983). The number of animals and intensity of noxious stimuli used were the minimum necessary to demonstrate consistent effects of the drug treatments.

## 2.12. Nociception induced by intraplantar injection of 2.5% formalin

The procedure used was similar to previously described (Hunskar, Fasmer, & Hole, 1985). The mice received  $20\text{ }\mu\text{L}$  of a 2.5% formalin solution (0.92% formaldehyde, in saline) intraplantarly under the ventral surface of the right hind paw. The animals were observed from 0 to 5 min (early phase) and 15 to 30 min (late phase) and the time that they spent licking the injected paw was considered as indicative of nociception. The animals were treated with vehicle [saline plus 5%  $\text{Me}_2\text{SO}$ ,  $10\text{ mL kg}^{-1}$ , intraperitoneally (i.p.)] or  $\beta$ -D-glucan (G-PHW) (1, 3 and  $10\text{ mg kg}^{-1}$ , i.p.), 30 min before the formalin injection.

## 2.13. Peritonitis induced by intraperitoneal injection of LPS

Peritonitis was induced with LPS according to Borges et al. (2014) with modifications. The mice were pre-treated with vehicle (saline plus 5%  $\text{Me}_2\text{SO}$ ,  $10\text{ mL kg}^{-1}$ ), dexamethasone (DEXA, a synthetic glucocorticoid,  $0.5\text{ mg kg}^{-1}$ ) or  $\beta$ -D-glucan (G-PHW) (1, 3 and  $10\text{ mg kg}^{-1}$ ) by i.p. route, 30 min before LPS injection ( $2\text{ }\mu\text{g kg}^{-1}$ , i.p.). Naive group received only sterile saline solution (0.9% NaCl,  $10\text{ mL kg}^{-1}$  i.p.). Four hours after the peritonitis induction, the mice were sacrificed and the peritoneal cavity was opened and washed with 1 mL of sterile saline containing heparin ( $25\text{ IU mL}^{-1}$ ). Then, the peritoneal fluid was collected to determine the total number of leukocytes and levels of myeloperoxidase (MPO).

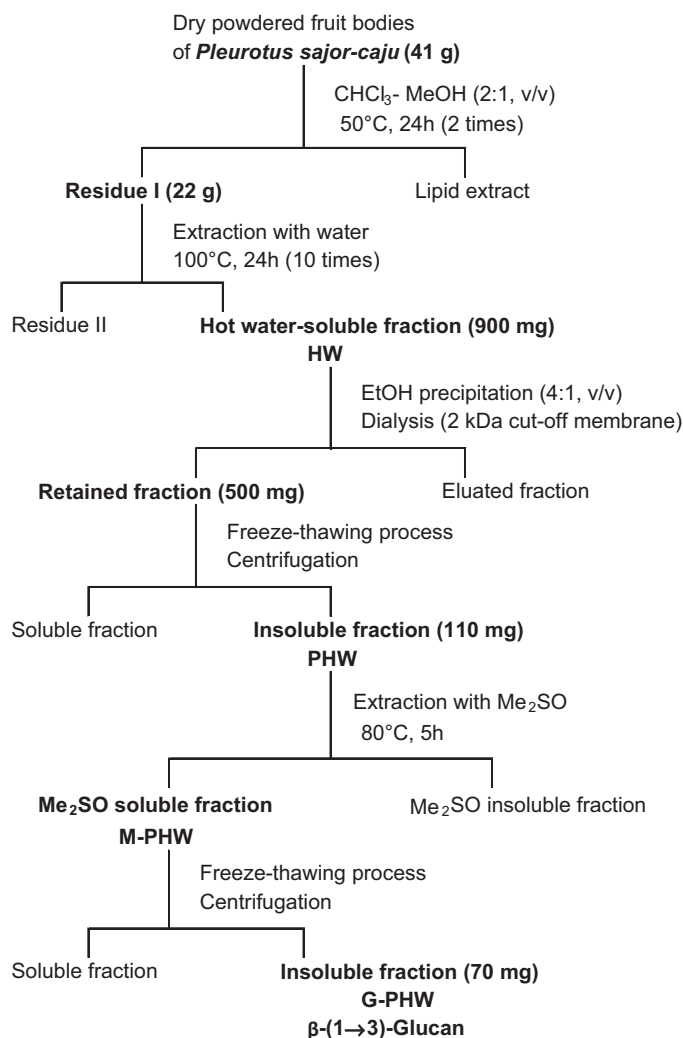
## 2.14. Quantification of total leukocytes and levels of myeloperoxidase (MPO)

An aliquot of the peritoneal fluid was diluted with Türk solution (1:20) and the total leukocyte counts were performed in a Neubauer chamber. For the measurement of MPO levels, samples of the peritoneal fluid were added to 80 mM potassium phosphate buffer (pH 5.4) containing 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB), and centrifuged at  $11,000 \times g$  for 20 min at  $4^\circ\text{C}$ . MPO levels of supernatants were determined in the presence of 0.017%  $\text{H}_2\text{O}_2$  and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine in dimethylformamide (TMB, 18.4 mM). The reaction was incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 3 min, and then stopped by the addition of sodium acetate (1.46 M, pH 3.0). The absorbance was measured using a microplate reader at 620 nm and MPO levels were expressed as units of optic density (O.D.)  $\text{mL}^{-1}$  (Da Silva et al., 2011).

## 2.15. Statistical analysis

The results of the cultured cell are expressed as mean  $\pm$  standard deviation of duplicate cultures of two representative experiments. Statistical significance was determined using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's test, selected pairs.  $P$  values  $< 0.05$  were considered statistically significant.





**Fig. 1.** Scheme of extraction and purification of β-D-glucan obtained from fruiting bodies of *Pleurotus sajor-caju*.

The results of the animal experiments are presented as the mean ± standard error of the mean (SEM), except for the ID<sub>50</sub> values (i.e., the dose of polysaccharide necessary to reduce the nociceptive response by 50% relative to the control value), which were reported as geometric means accompanied by their respective 95% confidence limits. The ID<sub>50</sub> value was determined by nonlinear regression from individual experiments using GraphPad software (San Diego, CA, USA). The statistical significance of differences between groups was detected by ANOVA followed by Newman–Keuls' test. *P* values < 0.05 were considered indicative of significance.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Purification process and chemical evaluation

After cultivation, the fruiting bodies (41 g) were freeze-dried, milled, and defatted with chloroform-methanol. Fig. 1 represents the scheme of extraction and purification of the β-D-glucan obtained from *P. sajor-caju*.

Defatted fruiting bodies (residue I) were submitted to extraction with hot water, to give the hot-water extract (HW). Polysaccharides present in HW were precipitated by addition of ethanol and recovered by centrifugation. The crude polysaccharide fraction (550 mg) was submitted to freeze and thaw mildly resulting

in a cold-water soluble fraction and a cold-water insoluble fraction (PHW, 110 mg). The latter was evaluated for its monosaccharide composition, presenting mannose (15.2%) and glucose (75.1%) as the main sugars. With the aim to purify this fraction, PHW was submitted to an extraction with Me<sub>2</sub>SO. The Me<sub>2</sub>SO-extract (M-PHW) was dialyzed and submitted to the freeze-thawing process to completely separate any water-soluble contaminant. The water-insoluble fraction (G-PHW, 70 mg) obtained yielded 1.7 mg g<sup>-1</sup> of dry mushroom. Me<sub>2</sub>SO extraction followed by freeze-thawing procedure was effective to obtain a purified glucan, since the glucose content increased of 75.1% (PHW) to 98% (G-PHW). This procedure seems to be successful to purify β-D-glucans, considering that linear (1 → 6)-linked β-D-glucans were isolated from *A. bisporus* and *A. brasiliensis* mushrooms using the same method (Smiderle et al., 2013).

The methylation analysis of G-PHW indicated the presence of 2,4,6-tri-*O*-methyl-Glcp (99.9%) and 2,3,4,6-tetra-*O*-methyl-Glcp (0.1%), relatives to a linear (1 → 3)-linked glucan structure. This D-glucan was analyzed by HPSEC-MALLS and its molecular weight was estimated at 6.0 × 10<sup>4</sup> g mol<sup>-1</sup>. The fractions PHW, M-PHW and G-PHW were analyzed by NMR spectroscopy and their <sup>13</sup>C-NMR spectra are depicted in Fig. 2A–C, respectively. By comparison of the spectra, it was possible to observe the reduction of minor signals and the evidence of six main signals, typical of a linear D-glucan. HSQC spectrum of G-PHW (Fig. 3) showed typical signals of a β-D-glucan (1 → 3)-linked observed at 102.8/4.41; 86.1/3.37; 76.2/3.13; 72.9/3.18; 68.3/3.12 and 60.8/3.59, 3.34, from C1/H1, C3/H3, C5/H5, C2/H2, C4/H4, and C6/H6, respectively. Similar signals were observed by Santos-Neves et al. (2008), and Synytsya and Novák (2013).

Linear β-D-glucans have been isolated from several mushrooms, but have not been reported in the *Pleurotus* genus yet. A (1 → 3)-β-D-glucan was isolated from a water-insoluble fraction from *Poria cocos* sclerotium (Hoffmann, Simson, & Timell, 1971), and from an aqueous 0.5 M NaOH/0.2 M urea solution (Chen, Xu, Zhang, & Kennedy, 2009) of the same mushroom. A similar β-D-glucan was isolated from the hot alkaline extract of fruiting bodies of *Termitomyces eurhizus* (Chakraborty, Mondal, Rout, & Islam, 2006), and from water-insoluble fraction from *Ganoderma lucidum* after extraction with aq. NaOH solution (Wang & Zhang, 2009).

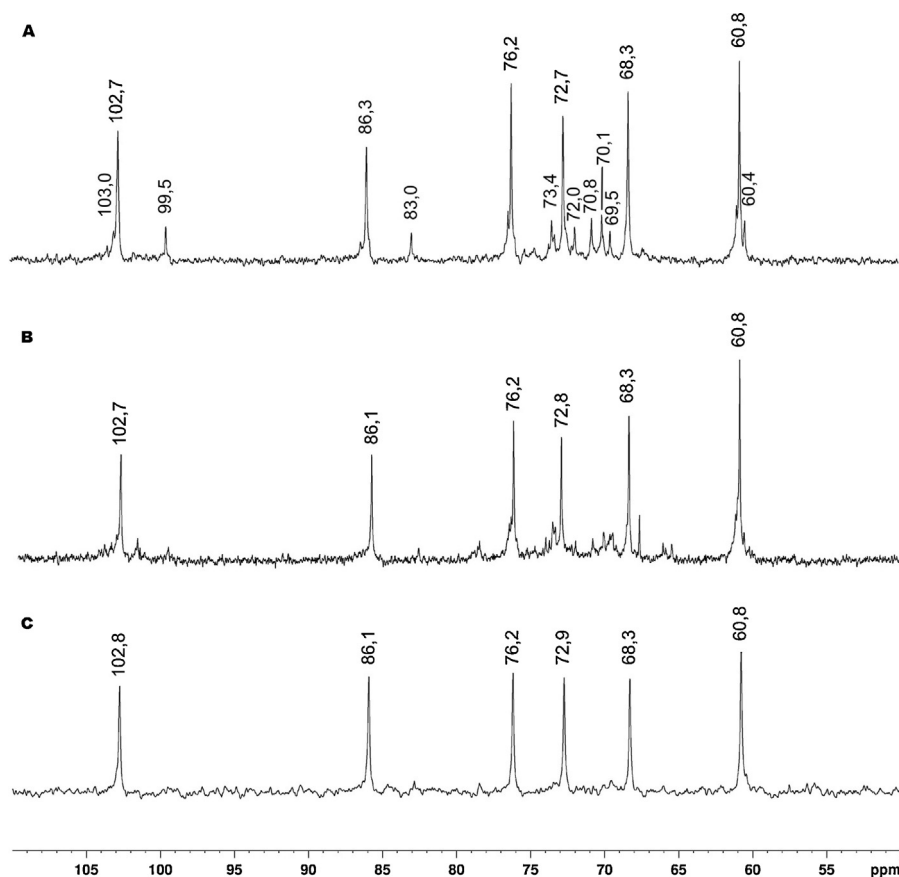
#### 3.2. Evaluation of the treatment with β-D-glucan in vitro

Considering that many studies have shown that β-D-glucans exhibit biological properties, the linear (1 → 3)-β-D-glucan from *P. sajor-caju* was tested on THP-1 cells. Therefore, the fraction G-PHW was added to the THP-1 macrophages at 10, 50, and 250 μg mL<sup>-1</sup> and the expression of pro-inflammatory genes (IL-1β, TNF-α, COX-2) was evaluated. For both incubation periods (3 h and 6 h), the β-D-glucan significantly stimulated the production of IL-1β and COX-2 mRNAs, while the TNF-α mRNA was significantly produced after 3 h of treatment (Fig. 4).

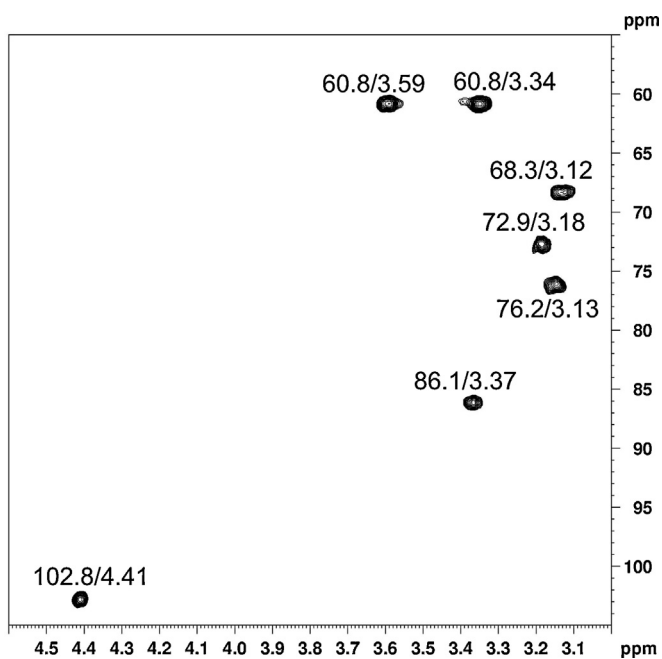
In order to test the ability of the β-D-glucan to reduce the effects caused by LPS stimulation, 1 μg mL<sup>-1</sup> of LPS plus 10, 50 or 250 μg mL<sup>-1</sup> of G-PHW was added to the cells concomitantly (Fig. 5). After 3 h and 6 h of incubation, the cells showed a significant lower expression of TNF-α, with an inhibition of 61.8 ± 5.74% (50 μg mL<sup>-1</sup>, 3 h) and 77.5 ± 0.99% (250 μg mL<sup>-1</sup>, 6 h), respectively. IL-1β and COX-2 mRNAs were also significantly inhibited after 3 h of incubation. At the concentration of 250 μg mL<sup>-1</sup>, IL-1β mRNA was inhibited at 37.0 ± 0.67%, while COX-2 mRNA was inhibited at 63.6 ± 2.76%.

These results suggest that the linear (1 → 3)-β-D-glucan from *P. sajor-caju* exhibits an immunomodulatory effect on THP-1 macrophages, stimulating the production of pro-inflammatory





**Fig. 2.**  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of  $\beta$ -D-glucan obtained from fruiting bodies of *Pleurotus sajor-caju*, in  $\text{D}_2\text{O}$  at  $70^\circ\text{C}$ : (A) PHW, and in  $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$  at  $70^\circ\text{C}$ : (B) M-PHW, and (C) G-PHW (purified  $\beta$ -D-glucan).



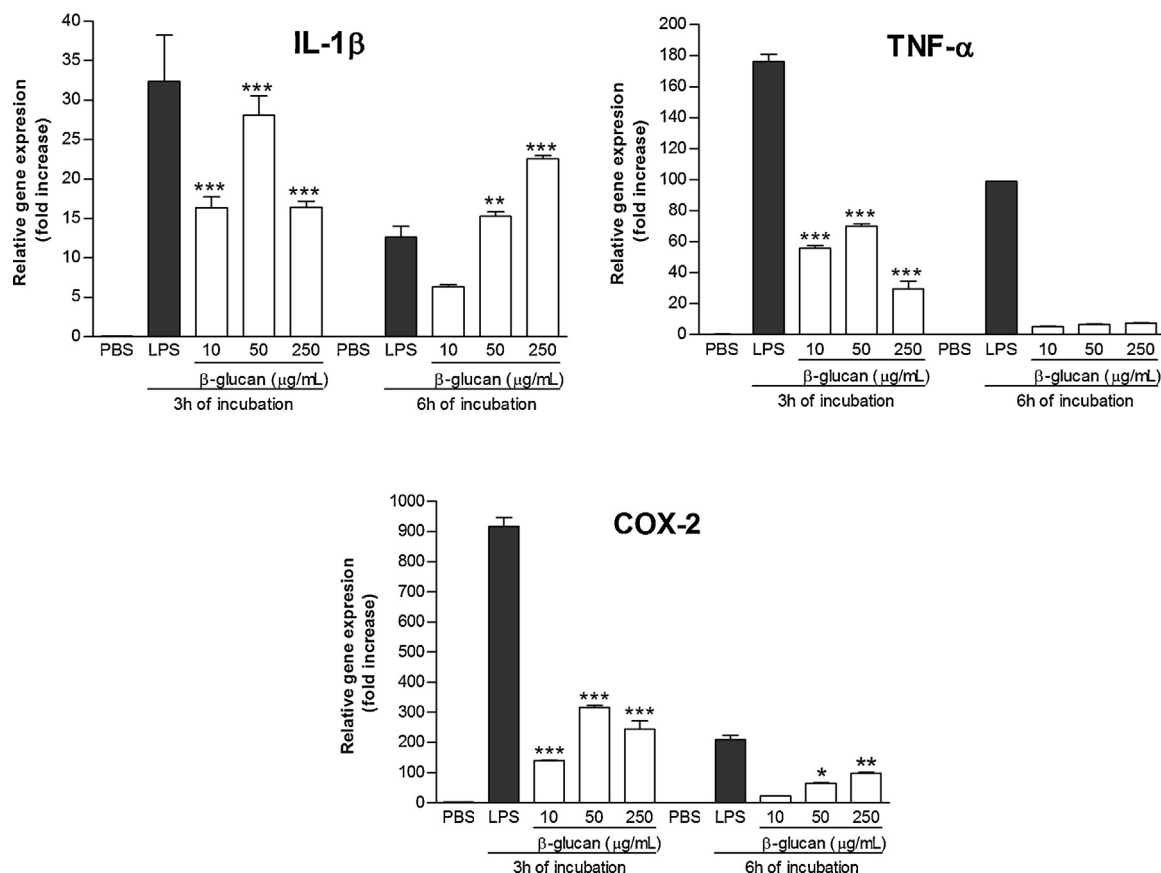
**Fig. 3.** HSQC spectrum of the  $\beta$ -D-glucan obtained from *Pleurotus sajor-caju*, in  $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$  at  $70^\circ\text{C}$  (chemical shifts are expressed in ppm).

genes when incubated alone, although it inhibits their production when administered with LPS, a strong inflammatory agent. The  $(1 \rightarrow 6)$ -linked  $\beta$ -D-glucans isolated from *A. bisporus* and *A. brasiliensis* also exhibited an immunomodulatory effect when incubated with THP-1 derived macrophages (Smiderle et al., 2013). Both glucans were able to stimulate the expression of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and COX-2, when incubated with that cells. When the macrophages were incubated with LPS +  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  6)-D-glucan, the same inhibitory effect was observed only for IL-1 $\beta$  and COX-2 genes. The curdlan, a  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  3)-D-glucan from Sigma ( $M_w$  not provided), activated the production of IL-1 $\beta$  by macrophages, through binding to dectin-1 receptor (Kankkunen et al., 2010). Researchers have observed that pattern recognition receptors (PRRs) of immune cells, such as dectin-1, complement receptor 3 (CR3), scavenger receptors, lactosylceramide (LacCer), and toll-like receptors (TLRs), recognize the  $\beta$ -D-glucans and initiate immune responses (Chen & Seviour, 2007). Although more information is required to understand how these molecules act after binding to the PRRs and which receptor is the preferable.

To obtain more information on how the  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  3)-D-glucan from *P. sajor-caju* can act in a biological system, the effects of this polysaccharide were evaluated *in vivo*.

### 3.3. Evaluation of the treatment with $\beta$ -D-glucan *in vivo*

Previous studies have demonstrated that branched  $(1 \rightarrow 3)$ ,  $(1 \rightarrow 6)$ - $\beta$ -D-glucans isolated from *P. sajor-caju* exhibit antineoplastic and immunostimulatory effects, and modulate the expression of



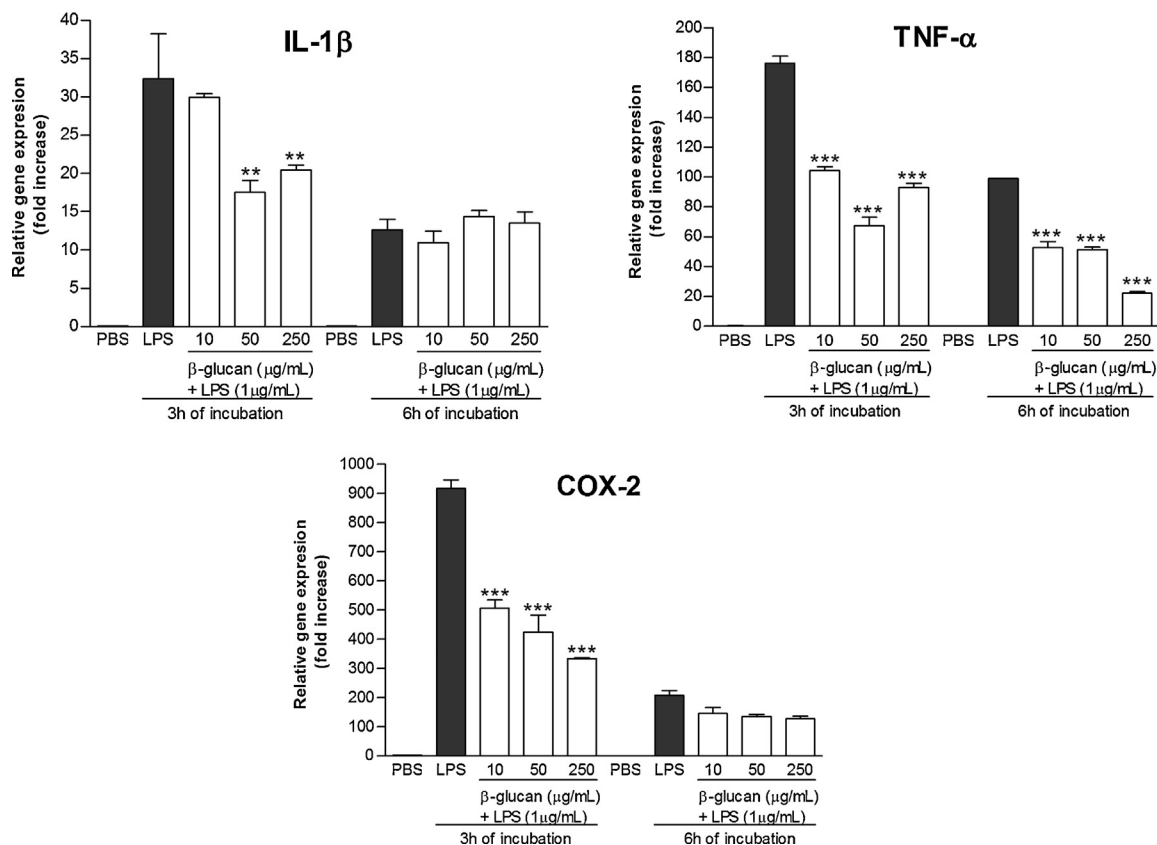
**Fig. 4.** mRNA expression level of genes IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and COX-2 after treatment with G-PHW for 3h and 6h. *Footnote:* Negative control (PBS) and positive control (LPS; 1  $\mu$ g mL $^{-1}$ ). G-PHW ( $\beta$ -D-glucan) was added at concentrations of 10, 50, and 250  $\mu$ g mL $^{-1}$ . Statistical analyses were performed by means of one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's test, selected pairs. The results represent the mean  $\pm$  SD of duplicate cultures of two representative experiments. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$  versus negative control.

some inflammatory markers (Carbonero et al., 2012; Dalonso et al., 2010; Satitmanwiwat et al., 2012). However, there is no information about the biological properties of linear (1  $\rightarrow$  3)- $\beta$ -D-glucan from any species of *Pleurotus*. Besides, it was observed that (1  $\rightarrow$  3), (1  $\rightarrow$  6)- $\beta$ -D-glucans from *P. pulmonarius* and *Lactarius rufus* exhibited marked anti-inflammatory and antinociceptive effects (Ruthes et al., 2013; Smiderle et al., 2008). Taking into account that the linear (1  $\rightarrow$  3)- $\beta$ -D-glucan showed an anti-inflammatory effect *in vitro*, a study was performed to evaluate its possible anti-inflammatory and antinociceptive properties *in vivo*. For these experiments, the formalin test was used in mice, which is considered a classical chemical model of inflammatory pain. Results showed that intraperitoneal administration of the  $\beta$ -D-glucan did not reduce the nociceptive response of neurogenic pain (first phase) (Fig. 6A) but significantly inhibited the nociception of inflammatory pain (second phase) induced by formalin, with an ID<sub>50</sub> value of 2.09 (1.71–2.56) mg kg $^{-1}$  and inhibition of 98  $\pm$  2% at a dose of 10 mg kg $^{-1}$  (Fig. 6B). Ruthes et al. (2013) produced a linear (1  $\rightarrow$  3)-linked  $\beta$ -D-glucan as a product of controlled Smith degradation from a (1  $\rightarrow$  3), (1  $\rightarrow$  6)-linked  $\beta$ -D-glucan isolated from *L. rufus*. The linear polysaccharide ( $M_w$  not determined) inhibited the nociceptive behavior of the neurogenic phase by 58  $\pm$  4%, and of the inflammatory phase by 80  $\pm$  9%, at a dose of 30 mg kg $^{-1}$ . Considering the dose used, it was less potent in reducing the inflammatory phase than the  $\beta$ -D-glucan isolated in the present study. The molecular weight of polysaccharides may influence their bioactivity (El Enshasy & Hatti-Kaul, 2013), although

in this case it was not possible to confirm this hypothesis. The branched (1  $\rightarrow$  3), (1  $\rightarrow$  6)- $\beta$ -D-glucan (11.3  $\times$  10 $^4$  g mol $^{-1}$ ) (Ruthes et al., 2013) showed similar inhibition of the inflammatory phase (96  $\pm$  3%) in comparison with the linear  $\beta$ -D-glucan from *P. sajor-caju* (98  $\pm$  2%). However, the lentinan-type glucan was less potent, considering that it was administered at a dose 3  $\times$  higher than the linear  $\beta$ -D-glucan.

The injection of formalin evokes two distinct phases: a first phase (1–5 min after injection, approximately) and a second phase (15–60 min approximately) of pain sensation in humans and nociceptive behavior in animals (Porro & Cavazzuti, 1993; Tjølsen, Berge, Hunskaar, Rosland, & Hole, 1992). The first phase of the formalin response is due to the excitation of spinal cord neurons by impulses from primary afferent fibers. The second phase is due to an increase in the spinal cord concentration of neuropeptides, excitatory amino acids, and pro-inflammatory mediators (Hunskaar & Hole, 1987; Porro & Cavazzuti, 1993; Tjølsen et al., 1992). Taking into account that the  $\beta$ -D-glucan inhibited inflammatory pain, its anti-inflammatory effect *in vivo* was evaluated.

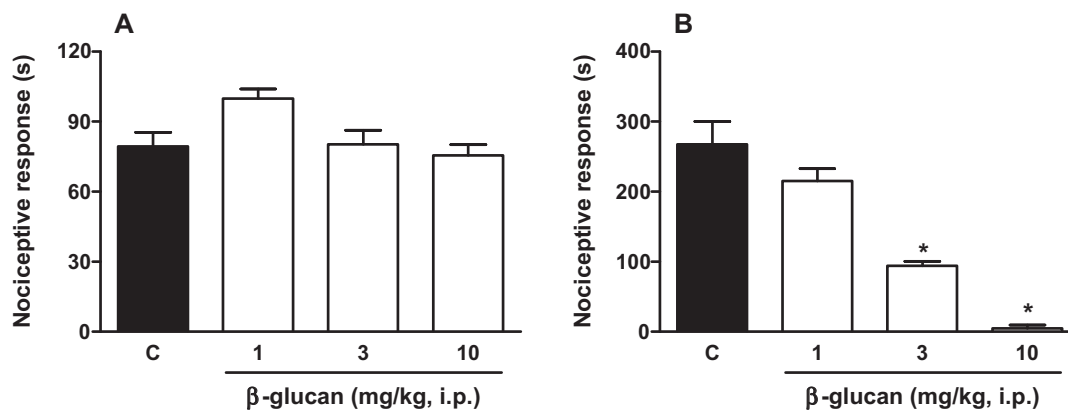
For this evaluation, bacterial lipopolysaccharide (LPS, 2  $\mu$ g kg $^{-1}$ ) was administered in mice, by intraperitoneal route, to promote an acute inflammatory response. This inflammation model is characterized by recruitment and activation of leukocytes (both mononuclear cells and neutrophils), which are responsible of releasing pro-inflammatory mediators (Ni et al., 2010). After 4 h of LPS application, an increase of total leukocyte number was observed in the peritoneal fluid when compared to animals treated



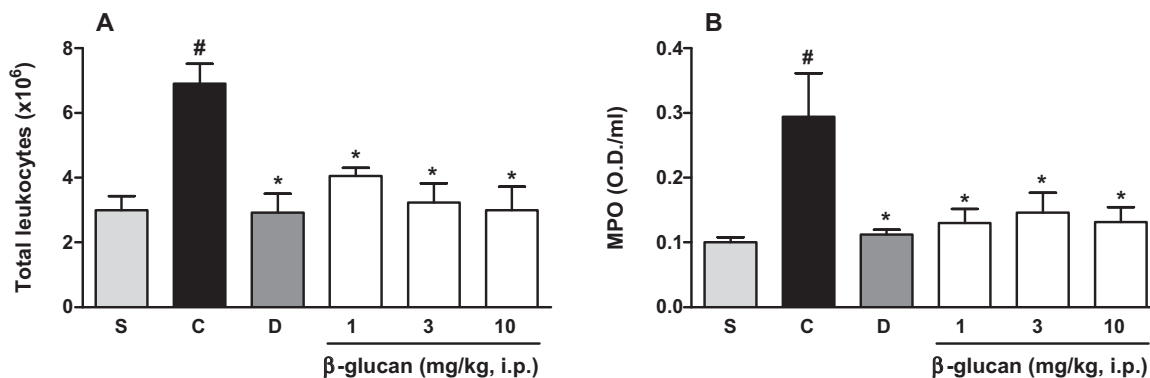
**Fig. 5.** mRNA expression level of genes IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and COX-2 after treatment with LPS + G-PHW for 3 h and 6 h. *Footnote:* Negative control (PBS) and positive control (LPS; 1  $\mu$ g mL $^{-1}$ ). G-PHW ( $\beta$ -D-glucan) was added at concentrations of 10, 50, and 250  $\mu$ g mL $^{-1}$ . Statistical analyses were performed by means of one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's test, selected pairs. The results represent the mean  $\pm$  SD of duplicate cultures of two representative experiments. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$  versus positive control.

only with saline (S:  $2.99 \pm 0.44 \times 10^6$  cells) (Fig. 7A) Furthermore, the treatment of mice with  $\beta$ -D-glucan (1, 3 and 10 mg kg $^{-1}$ , i.p.) and dexamethasone (positive control of the test, 0.5 mg kg $^{-1}$ , i.p.) markedly reduced the migration of total leukocytes by  $73 \pm 7$ ,  $94 \pm 15$ , 100 and 100%, respectively, compared to control group (C:  $6.90 \pm 0.62 \times 10^6$  cells) (Fig. 7A). Similarly, the MPO level, an indirect marker of neutrophils, was increased by LPS treatment from

$0.10 \pm 0.01$  to  $0.29 \pm 0.07$  O.D. mL $^{-1}$  (Fig. 7B). The  $\beta$ -D-glucan (1, 3 and 10 mg kg $^{-1}$ , i.p.) and dexamethasone treatments reduced the MPO levels by  $84 \pm 11$ ,  $76 \pm 16$ ,  $84 \pm 12$  and  $94 \pm 4\%$ , respectively, compared to the control group (Fig. 7B). The results confirm the anti-inflammatory activity of the linear (1  $\rightarrow$  3)- $\beta$ -D-glucan from *P. sajor-caju*, reducing the migration of total leukocytes, mainly of neutrophils.



**Fig. 6.** Effect of  $\beta$ -D-glucan on neurogenic (panel A) and inflammatory phase (panel B) of nociception induced by formalin in mice. *Footnote:* The animals received vehicle (C: saline plus 5% Me $_2$ SO, 10 mL kg $^{-1}$ , i.p.) or G-PHW ( $\beta$ -D-glucan) (1, 3 and 10 mg kg $^{-1}$ , i.p.) 30 min before formalin administration. Statistical analyses were performed by means of one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls' test. The results represent the mean  $\pm$  SEM of 6–8 animals. \*  $P < 0.05$  versus control group.



**Fig. 7.** Effect of  $\beta$ -D-glucan on number of total leukocytes (panel A) and myeloperoxidase levels (panel B) induced by LPS in mice. *Footnote:* The animals received vehicle (C: saline plus 5% Me<sub>2</sub>SO, 10 mL kg<sup>-1</sup>, i.p.), dexamethasone (D: 0.5 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.) or G-PHW ( $\beta$ -D-glucan) (1, 3 and 10 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.) 30 min before LPS administration. Naive group received only sterile saline (S: 10 mL kg<sup>-1</sup>, i.p.). Statistical analyses were performed by means of one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman–Keuls' test. The results represent the mean  $\pm$  SEM of 6–8 animals. <sup>#</sup>  $P < 0.05$  versus naive group; <sup>\*</sup>  $P < 0.05$  versus control group.

#### 4. Conclusion

*P. sajor-caju* fruiting bodies cultivated in banana straw, produced a linear  $\beta$ -D-glucan (1  $\rightarrow$  3)-linked. This is the first report of such structure isolated from *Pleurotus* genus. An immunomodulatory effect was observed when THP-1 macrophages were treated with the  $\beta$ -D-glucan, which stimulated the production of pro-inflammatory genes when incubated alone. However, the  $\beta$ -D-glucan inhibited production of pro-inflammatory genes when administered with LPS, suggesting an anti-inflammatory effect. The linear  $\beta$ -D-glucan was able to inhibit the inflammatory phase of nociception induced by formalin in a low dose and reduced the number of total leukocytes and myeloperoxidase (MPO) levels induced by LPS. The results observed reinforce the importance of mushroom polysaccharides, as biological response modifiers, and particularly for anti-inflammatory applications.

#### Acknowledgments

The authors would like to thank the Brazilian funding agencies: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Fundação Araucária. C.H. Baggio is recipient of post-doctoral scholarship from CAPES.

#### References

- Borges, F. R., Silva, M. D., Córdova, M. M., Schambach, T. R., Pizzolatti, M. G., & Santos, A. R. (2014). Anti-inflammatory action of hydroalcoholic extract, dichloromethane fraction and steroid  $\alpha$ -spinasterol from *Polygala sabulosa* in LPS-induced peritonitis in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 151(1), 144–150.
- Carbonero, E. R., Gracher, A. H. P., Smiderle, F. R., Rosado, F. R., Sassaki, G. L., Gorin, P. A. J., & Iacomini, M. (2006). A  $\beta$ -glucan from the fruit bodies of edible mushrooms *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatus*. *Carbohydrate Polymers*, 66, 252–257.
- Carbonero, E. R., Ruthes, A. C., Freitas, C. S., Utrilla, P., Gálvez, J., Silva, E. V., Sassaki, G. L., Gorin, P. A., & Iacomini, M. (2012). Chemical and biological properties of a highly branched  $\beta$ -glucan from edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*. *Carbohydrate Polymers*, 90(2), 814–819.
- Ciucanu, I., & Kerek, F. (1984). A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research*, 131, 209–217.
- Chakraborty, I., Mondal, S., Rout, D., & Islam, S. S. (2006). A water-insoluble (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucan from the alkaline extract of an edible mushroom *Termitomyces eurhizus*. *Carbohydrate Research*, 341, 2990–2993.
- Chanput, W., Mes, J., Vreeburg, R. A. M., Savelkoul, H. F. J., & Wichers, H. J. (2010). Transcription profiles of LPS-stimulated THP-1 monocytes and macrophages: A tool to study inflammation modulating effects of food-derived compounds. *Food and Function*, 1, 254–261.
- Chen, J., & Seviour, R. (2007). Medicinal importance of fungal  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6)-glucans. *Mycological Research*, 111, 635–652.
- Chen, X., Xu, X., Zhang, L., & Kennedy, J. F. (2009). Flexible chain conformation of (1  $\rightarrow$  3)- $\beta$ -D-glucan from *Poria cocos* sclerotium in NaOH/urea aqueous solution. *Carbohydrate Polymers*, 75(4), 586–591.
- Dalonso, N., Souza, R., Silveira, M. L. L., Ruzza, A. A., Wagner, T. M., Wisbeck, E., & Furlan, S. A. (2010). Characterization and antineoplastic effect of extracts obtained from *Pleurotus sajor-caju* fruiting bodies. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160, 2265–2274.
- Da Silva, M. D., Guginski, G., Werner, M. F., Baggio, C. H., Marcon, R., & Santos, A. R. (2011). Involvement of interleukin-10 in the anti-inflammatory effect of Sanyinjiao (SP6) acupuncture in a mouse model of peritonitis. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2011. <http://dx.doi.org/10.1093/ecam/nek036>. Article ID 217946, 9 pages.
- El Enshasy, H. A., & Hatti-Kaul, R. (2013). Mushroom immunomodulators: Unique molecules with unlimited applications. *Trends in Biotechnology*, 31(12), 668–677.
- Furlan, S. A., Virmond, L. J., Miers, D. A., Bonatti, M., Gern, R. M. M., & Jonas, R. (1997). Mushrooms strains able to grow at high temperatures and low pH values. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13(6), 689–692.
- Hoffmann, G. C., Simson, B. W., & Timell, T. E. (1971). Structure and molecular size of pachyman. *Carbohydrate Research*, 20(1), 185–188.
- Hunskar, S., Fasmer, O. B., & Hole, K. (1985). Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. *Journal of Neuroscience Methods*, 14, 69–76.
- Hunskar, S., & Hole, K. (1987). The formalin test in mice: Dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*, 30, 103–114.
- Kanagasabapathy, G., Chua, K. H., Malek, S. N., Vikineswary, S., & Kuppusamy, U. R. (2014). AMP-activated protein kinase mediates insulin-like and lipo-mobilising effects of  $\beta$ -glucan-rich polysaccharides isolated from *Pleurotus sajor-caju* (Fr.). *Singer mushroom*, in 3T3-L1 cells. *Food Chemistry*, 145, 198–204.
- Kankkunen, P., Teirilä, L., Rintahaka, J., Alenius, H., Wolff, H., & Matikainen, S. (2010). (1,3)- $\beta$ -Glucans activate both dectin-1 and NLRP3 inflammasome in human macrophages. *The Journal of Immunology*, 184, 6335–6342.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-CT method. *Methods*, 25, 402–408.
- Maji, P. K., Sen, I. K., Behera, B., Maiti, T. K., Mallick, P., Sikdar, S. R., & Islam, S. S. (2012). Structural characterization and study of immunoenhancing properties of a glucan isolated from a hybrid mushroom of *Pleurotus florida* and *Lentinula edodes*. *Carbohydrate Research*, 358, 110–115.
- Ni, J., McLoughlin, R. M., Brodovitch, A., Moulin, P., Brouckaert, P., Casadei, B., Feron, O., Topley, N., Balligand, J. L., & Devuyst, O. (2010). Nitric oxide synthase isoforms play distinct roles during acute peritonitis. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 25(1), 86–96.
- Palacios, I., García-Lafuente, A., Guillaumon, E., & Villares, A. (2012). Novel isolation of water-soluble polysaccharides from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus* mushrooms. *Carbohydrate Research*, 358, 72–77.
- Porro, C. A., & Cavazzuti, M. (1993). Spatial and temporal aspects of spinal cord and brainstem activation in the formalin pain model. *Progress in Neurobiology*, 41, 565–607.
- Ruthes, A. C., Carbonero, E. R., Córdova, M. M., Baggio, C. H., Santos, A. R., Sassaki, G. L., Cipriani, T. R., Gorin, P. A., & Iacomini, M. (2013). *Lactarius rufus* (1  $\rightarrow$  3), (1  $\rightarrow$  6)- $\beta$ -D-glucans: Structure, antinociceptive and anti-inflammatory effects. *Carbohydrate Polymers*, 94(1), 129–136.
- Santos-Neves, J. C., Pereira, M. I., Carbonero, E. R., Gracher, A. H. P., Gorin, P. A. J., Sassaki, G. L., & Iacomini, M. (2008). A gel-forming  $\beta$ -glucan isolated from the fruit bodies of the edible mushroom *Pleurotus florida*. *Carbohydrate Research*, 343, 1456–1462.
- Sassaki, G. L., Gorin, P. A. J., Souza, L. M., Czelusniak, P. A., & Iacomini, M. (2005). Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards for GC-MS: Some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. *Carbohydrate Research*, 340, 731–739.
- Satitmanwivat, S., Ratanakhanokchai, K., Laohakunjit, N., Chao, L. K., Chen, S. T., Pason, P., Tachaapaikoon, C., & Kyu, K. L. (2012). Improved purity and

- immunostimulatory activity of  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)-glucan from *Pleurotus sajor-caju* using cell wall-degrading enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(21), 5423–5430.
- Smiderle, F. R., Olsen, L. M., Carbonero, E. R., Baggio, C. H., Freitas, C. S., Marcon, R., Santos, A. R. S., Gorin, P. A. J., & Iacomini, M. (2008). Anti-inflammatory and analgesic properties in a rodent model of a (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-linked  $\beta$ -glucan isolated from *Pleurotus pulmonarius*. *European Journal of Pharmacology*, 597, 86–91.
- Smiderle, F. R., Alquini, G., Tadra-Sfeir, M. Z., Iacomini, M., Wichers, H. J., & Van Griensven, L. J. L. D. (2013). *Agaricus bisporus* and *Agaricus brasiliensis* (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucans show immunostimulatory activity on human THP-1 derived macrophages. *Carbohydrate Polymers*, 94, 91–99.
- Synytsya, A., Míčková, K., Synytsya, A., Jablonský, I., Spěvák, J., Erban, V., Kovářková, E., & Čopíková, J. (2009). Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. *Carbohydrate Polymers*, 76, 548–556.
- Synytsya, A., & Novák, M. (2013). Structural diversity of fungal glucans. *Carbohydrate Polymers*, 92(1), 792–809.
- Tjølsen, A., Berge, O. G., Hunskaar, S., Rosland, J. H., & Hole, K. (1992). The formalin test: An evaluation of the method. *Pain*, 51, 5–17.
- Wang, J., & Zhang, L. (2009). Structure and chain conformation of five water-soluble derivatives of a  $\beta$ -D-glucan isolated from *Ganoderma lucidum*. *Carbohydrate Research*, 344(1), 105–112.
- Wolf from, M. L., & Thompson, A. (1963a). Acetylation. In R. L. Whistler, M. L. Wolf from, & J. N. BeMiller (Eds.), *Methods Carbohydrate Chemistry* (2) (pp. 211–215).
- Wolf from, M. L., & Thompson, A. (1963b). Reduction with sodium borohydride. In R. L. Whistler, M. L. Wolf from, & J. N. BeMiller (Eds.), *Methods Carbohydrate Chemistry* (2) (pp. 65–67). New York and London: Academic Press.
- Zhang, M., Cui, S. W., Cheung, P. C. K., & Wang, Q. (2007). Antitumor polysaccharide from mushrooms: A review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 4–19.
- Zhang, Y., Li, S., Wang, X., Zhang, L., & Cheung, P. C. K. (2011). Advances in lentinan: Isolation, structure, chain conformation and bioactivities. *Food Hydrocolloids*, 25, 196–206.
- Zimmermann, M. (1983). Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, 16, 109–110.



## Exopolysaccharide produced by *Pleurotus sajor-caju*: Its chemical structure and anti-inflammatory activity



Marcia L.L. Silveira<sup>a,b</sup>, Fhernanda R. Smiderle<sup>b</sup>, Franciane Agostini<sup>a</sup>, Eduardo M. Pereira<sup>a</sup>, Mariane Bonatti-Chaves<sup>a</sup>, Elisabeth Wisbeck<sup>a</sup>, Andréa Caroline Ruthes<sup>b</sup>, Guilherme L. Sasaki<sup>b</sup>, Thales R. Cipriani<sup>b</sup>, Sandra A. Furlan<sup>a</sup>, Marcello Iacomini<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Universidade da Região de Joinville, CEP 89219-710, Joinville SC, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, CP 19046, CEP 81531-980, Curitiba PR, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 11 November 2014

Received in revised form 9 January 2015

Accepted 11 January 2015

Available online 17 January 2015

#### Keywords:

*Pleurotus sajor-caju*

Exopolysaccharide

Mannogalactan

### ABSTRACT

Edible mushrooms are high nutritional value foods, which contain proteins, fibers, minerals, vitamins, and carbohydrates. Among their carbohydrates are some polysaccharides with recognized therapeutic effects. It was reported in this manuscript the structural characterization and antinociceptive and anti-inflammatory activities of an exopolysaccharide (EPS) produced by *Pleurotus sajor-caju*. The purified EPS was a mannogalactan (PEIsR), which was composed by mannose (37.0%), galactose (39.7%), and 3-O-methyl-galactose (23.3%). The polysaccharide was purified by freeze-thawing and dialysis, and it was characterized by GC-MS analysis and NMR spectroscopy. The mannogalactan is constituted by a main chain of (1→6)-linked  $\alpha$ -D-Galp and 3-O-methyl- $\alpha$ -D-Galp units. Some of the  $\alpha$ -D-Galp units were substituted at O-2 by non-reducing end units of  $\beta$ -D-Manp. According to the literature review conducted, this is the first time that a methylated polysaccharide was observed on EPS of *P. sajor-caju*. The mannogalactan was able to reduce the nociception, *in vivo*, in the writhing and formalin tests and also reduced the carrageenan-induced paw edema, which indicates that it could be an effective antinociceptive and anti-inflammatory agent.

© 2015 Published by Elsevier B.V.

## 1. Introduction

Edible mushrooms have been consumed for centuries and are appreciated not only for their texture and flavor but also for their nutritional value. Mushrooms are rich in proteins, fibers, secondary metabolites, minerals, vitamins, and present low amounts of fat and calories [1,2]. Moreover, some mushroom compounds, such as polysaccharides, have shown therapeutic effects. Among the effects, the most reported are the antitumoral, antinociceptive, anti-inflammatory, and immunoenhancing activities [3–5].

Fungi polysaccharides are usually extracted from the mushroom fruiting bodies [4–7], and the most common are homoglycans, such as (1→3), (1→6)-linked  $\beta$ -D-glucans [5]. Several biological effects have been reported to these glucans [3]. In addition, heteropolysaccharides as heterogalactans, galactomannans, mannoglucans, have

also been extracted [6–9]. Mannogalactans were isolated from the fruiting bodies of several *Pleurotus* species (*P. eryngii*, *P. geesteranus*, *P. pulmonarius*, *P. ostreatus* 'florida', and *P. ostreatoroseus*) [6–8,10]. It was observed that the mannogalactan from *P. pulmonarius* presented a marked antinociceptive effect when tested in mice, which shows that the heteropolysaccharides of mushrooms can also exhibit therapeutic properties [6].

Fungi polysaccharides can also be obtained by submerged liquid fermentation, and be recovered from the culture broth, as exopolysaccharides, or extracted from the mycelium [11]. This is a biotechnological approach that allows a better control of the production of bioactive polysaccharides by fungi [12].

The submerged liquid fermentation has been used to obtain polysaccharides produced by a variety of basidiomycetes of the *Pleurotus* genus. However, information about purification and chemical characterization of these polymers are uncommon [2,13].

In the present study, a mannogalactan was produced by *Pleurotus sajor-caju* using the submerged liquid fermentation technique. This polysaccharide was purified and chemically characterized, and its antinociceptive and anti-inflammatory effects were evaluated.

\* Corresponding author. Tel.: +55 41 3361 1655; fax: +55 41 3266 2042.  
E-mail address: [iacomini@ufpr.br](mailto:iacomini@ufpr.br) (M. Iacomini).



## 2. Materials and methods

### 2.1. Microorganism and submerged liquid fermentation

*Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer was obtained from the Botanical Sciences Center of the Institute of Botany of São Paulo, Brazil (under the code CCB 019) and maintained in Petri dishes containing WDA (1 L of wheat extract, 20 g of dextrose, and 15 g of agar) at 4 °C [14].

The submerged liquid fermentation initiated by preparing the inoculum in 2 L Duran flasks containing 400 mL of medium using the best condition for the EPS production, defined by Assis et al. [15]. The composition of the medium was 2.5 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.2 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1.0 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.0 g/L peptone, 1.0 g/L CaCO<sub>3</sub>, with an initial glucose concentration of 20 g/L, without yeast extract. The flasks were inoculated with 7-days-old mycelium (grown in a Petri dish). After inoculation, the flasks were incubated at 30 °C and maintained under reciprocal stirring at 120 rpm for six days. The inoculum (400 mL) was then transferred to the bioreactor to initiate the culture.

The submerged liquid fermentations were conducted as batch processes using a stirred tank bioreactor Biostat B model with a working volume of 4 L, using the same medium as described above. The experiments were performed at 30 °C, at 300 rpm, with an air flow of 0.25 L/min, and an initial K<sub>L</sub> a (oxygen transfer coefficient) value of 15 h<sup>-1</sup>. The pH was maintained at 4.0. The fermentations were interrupted when glucose reached a minimal concentration (determined by glucose oxidase kit, Glucox 400, Doles Reagents), at time 490 h. After that, the fermented liquid and biomass were separated by centrifugation.

### 2.2. Extraction and purification of the exopolysaccharide (EPS)

The extraction and purification of the EPS from the fermented liquid of *P. sajor-caju* were performed according to Fig. 1. The fermented liquid was concentrated to reach 800 mL, to which four volumes of cold EtOH were added. This procedure yielded a precipitate (PE), which was separated by centrifugation (4.500 × g, 20 min, 4 °C), dialyzed (2 kDa cut-off membrane) against distilled water to remove low molecular weight compounds, and freeze-dried to obtain a retentate fraction (PEI). This fraction was dissolved in water (100 mL) and submitted to freeze-thawing process [16] several times, yielding a soluble (PEIs) and an insoluble (PEIi) fractions.

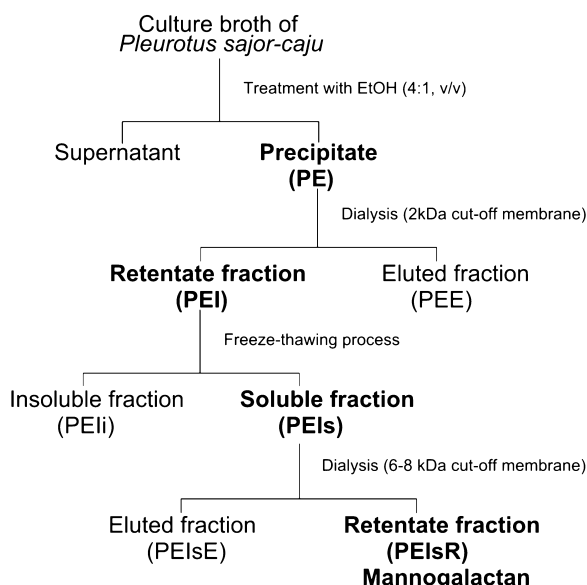


Fig. 1. Extraction and purification of the mannogalactan (PEIsR).

(PEIi) fractions, which were separated by centrifugation (4.500 × g, 20 min, 4 °C). The soluble fraction (PEIs) was subjected to closed dialysis in a 6–8 kDa cut-off membrane against distilled water, to yield a retentate (PEIsR) and an eluted (PEIsE) fractions.

### 2.3. Monosaccharide analysis

Each EPS fraction (~2 mg) was hydrolyzed with TFA (1 M) at 100 °C for 12 h and then evaporated to dryness. The monosaccharides were successively reduced with NaBH<sub>4</sub> or NaBD<sub>4</sub> and acetylated with Ac<sub>2</sub>O-pyridine (1:1, v/v; 300 µL) for 12 h at room temperature. The resulting alditol acetates were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) using a Varian Saturn 2000R-3800 gas chromatograph coupled to a Varian Ion-Trap 2000R mass spectrometer, with He as the carrier gas. A DB-225 capillary column (30 m × 0.25 mm i.d.), which was maintained at 50 °C during injection and then programmed to increase to 220 °C at a rate of 40 °C/min, was used for the quantitative analysis of the alditol acetates. The products were identified by their typical retention times and electron impact profiles.

### 2.4. Methylation analysis

The per-O-methylation of the mannogalactan (10 mg) was performed by dissolution in DMSO (0.5 mL), followed by addition of iodomethane (0.5 mL) and powdered NaOH (200 mg) [17]. The sample was subjected to vigorous stirring for 30 min at room temperature, and then maintained quiescent overnight. The reaction was interrupted with water and neutralized with HOAc. The per-O-methylated derivatives were recovered by partitioning with CHCl<sub>3</sub>. After drying the CHCl<sub>3</sub>, the per-O-methylated derivatives were subjected to hydrolysis using 45% HCO<sub>2</sub>H at 100 °C for 10 h and then evaporated to dryness. The resulting mixture of O-methyl monosaccharides was reduced with NaBD<sub>4</sub> and acetylated with Ac<sub>2</sub>O-pyridine (1:1, v/v; 300 µL) for 12 h at room temperature to obtain a mixture of O-methylaliditol acetates. These derivatives were analyzed by GC-MS using the same conditions as described for alditol acetates (item 2.3), with the exception that the final temperature was 215 °C. These derivatives were identified by their typical retention times and electron impact spectra [18].

### 2.5. HPSEC analysis

Homogeneity and average molar mass (*M<sub>w</sub>*) of the mannogalactan were determined by high-performance size-exclusion chromatography (HPSEC) coupled to refractive index (RID) and multi-angle laser light-scattering detectors (MALLS) [19]. Four gel-permeation Ultrahydrogel columns in series with exclusion sizes of 7 × 10<sup>6</sup>, 4 × 10<sup>5</sup>, 8 × 10<sup>4</sup>, and 5 × 10<sup>3</sup> Da, were used. The eluent was 0.1 M aq. NaNO<sub>2</sub> containing 200 ppm aq. NaN<sub>3</sub> at 0.6 mL/min. The sample, previously filtered through a membrane (0.22 µm), was injected (100 µL loop) at a concentration of 1 mg/mL. The specific refractive index increment (dn/dc) was determined, and the results were processed with software provided by the manufacturer (Wyatt Technologies) [20].

### 2.6. NMR spectroscopy

The NMR spectra were obtained using a 400-MHz Bruker model DRX Avance spectrometer. The <sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz) and <sup>1</sup>H-NMR (400.13 MHz) analyses were performed at 70 °C, and the samples were dissolved in Me<sub>2</sub>SO-*d*<sub>6</sub>. The chemical shifts were expressed in ppm (δ) relative to Me<sub>2</sub>SO-*d*<sub>6</sub> at δ 39.7 (<sup>13</sup>C) and δ 2.40 (<sup>1</sup>H). The NMR signals were assigned according to <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C HSQC and 1D selective TOCSY experiments, and literature data.

## 2.7. Animal and ethical considerations

The studies were performed using male Swiss mice weighing 25–30 g, provided by the TECPAR (Paraná/Brazil). The animals were kept under standard laboratory conditions (12 h light/dark cycles, temperature  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) with food and water provided *ad libitum*. The animals were acclimatized to the laboratory for at least 12 h before testing and were used only once for experiments.

All of the procedures used in this study were approved by the Research Ethical Committee of the University of Region of Joinville (UNIVILLE) according to the protocol number 014/2011 to ensure that this study follows what is disposed on the Federal Brazilian Laws (Law n.11.794/2008) that guide tests using animals.

## 2.8. Writhing test

The mice were treated intraperitoneally with different doses of the mannogalactan (PEIsR) (0.01; 0.03; 0.1; 0.3; 1.0, or 3.0 mg/kg). The polysaccharide was suspended in 0.5% carboxymethylcellulose solution (CMC) prior to injection. The non-treated group received only the vehicle (CMC solution, 10 mL/kg, i.p.).

The nociception was induced by an injection of 0.9% HOAc solution (10 mL/kg, i.p.) 30 min after the treatment or vehicle administration. The animals were placed under glass funnels, and the number of writhing episodes over a period of 20 min was recorded [21]. The antinociceptive activity was determined through a comparison of the abdominal writhings of the treated group and the non-treated group.

The negative control group (NC) received 0.9% saline solution (10 mL/kg, i.p.) instead of the HOAc injection.

## 2.9. Formalin test

Formalin causes local tissue injury to the paw and has been used as a model for tonic pain and localized inflammatory pain. The treated group received mannogalactan (PEIsR) in 0.1 mg/kg (i.p.), (dose selected according to the writhing test), suspended in 0.5% CMC solution and the non-treated group received only the vehicle (CMC solution, 10 mL/kg, i.p.). After 30 min, a formalin solution (2.5%, 20  $\mu\text{L}$ ) was injected to the animals into the subplantar region of the left hind paw. Nociceptive behaviors include various manifestations, such as licking, lifting, and vigorous shaking of the paw that received the stimulus. The nociception was quantified by the licking time after the formalin injection. Initially, the animals were observed during the 1st phase, which corresponds to a direct chemical stimulation of nociceptors and initiates right after the formalin injection and lasts 5 min. Then, the 2nd phase, that involves inflammation and starts 15 min after the formalin injection, was evaluated up to 30 min [22].

The negative control group (NC) received 0.9% saline solution (10 mL/kg, i.p.) instead of the formalin injection.

## 2.10. Paw edema induced by carrageenan

Paw edema was induced through the injection of 1% carrageenan solution (30  $\mu\text{L}$ ) into the subplantar region of the right hind paw of mice.

The animals received the treatment (mannogalactan, PEIsR, 0.1 mg/kg, i.p.) 30 min prior to (Pre) or 30 min after (Post) the carrageenan injection. The positive control group (Dexa) received dexamethasone (0.1 mg/kg, i.p.), and the non-treated group received only the vehicle (0.5% CMC solution, 10 mL/kg, i.p.) 30 min before the carrageenan injection.

The negative control group (NC) did not receive the carrageenan injection; instead, these animals received 0.9% saline solution

(30  $\mu\text{L}$ ) in the subplantar region of the right hind paw 30 min after being treated with the vehicle (0.5% CMC solution, 10 mL/kg, i.p.).

## 2.11. Statistical analysis

The results of the antinociceptive and anti-inflammatory experiments are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). The significant difference between groups ( $n = 8$ ) was analyzed through one-way ANOVA followed by Tukey test.  $P < 0.05$  was considered statistically significant. The graphs were drawn and the statistical analyses were performed using the Origin 8.0 PRO® software.

# 3. Results and discussion

## 3.1. Production and structural characterization of the mannogalactan

The fermentation of *P. sajor-caju* was developed in a biorreactor, using a medium without yeast extract (item 2.1). Yeast extract is commonly added to culture mediums with the aim of providing nitrogen sources, although it has been observed that this extract contains mannans and other polysaccharides, which can be mistaken as EPS produced by the submerged culture microorganism [23].

The fermented liquid of the submerged culture of *P. sajor-caju* was added to four volumes of EtOH to obtain a crude precipitate of polysaccharides (PE). PE yielded 0.94 g/L and was subjected to dialysis using a 2-kDa cut-off membrane to remove the low-molecular-weight compounds. The retentate fraction (PEI 12 g) was used to continue the characterization.

PEI was submitted to a freezing-thawing process to separate the insoluble fraction (PEIi) from the soluble one (PEIs). The HPSEC analysis showed that the PEIs was heterogeneous (Fig. 2) and presented the following monosaccharide components: mannose (43.6%), galactose (28.8%), 3-O-methyl-galactose (22.9%), and glucose (4.6%). The position of the methyl group on the galactose residues was confirmed by the presence of fragments with  $m/z$  130 and 190 on the GC-MS analysis using NaBD<sub>4</sub> as the reducing agent to prepare the alditol acetates [18]. The PEIs was dialyzed using a 6–8 kDa cut-off membrane to obtain an eluted (PEIsE) and a retentate (PEIsR) fraction. The latter showed a homogeneous

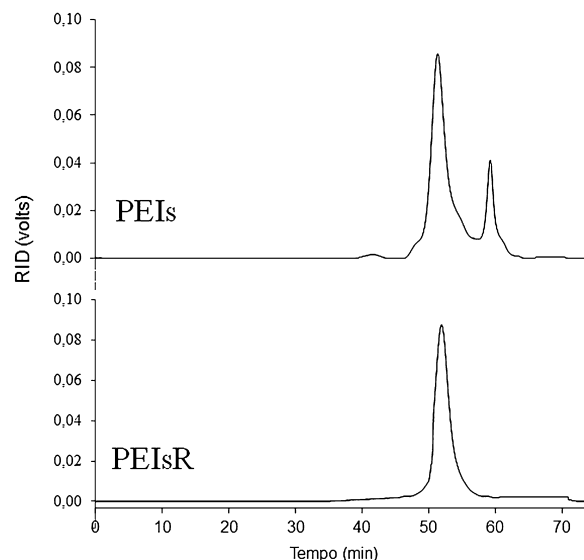
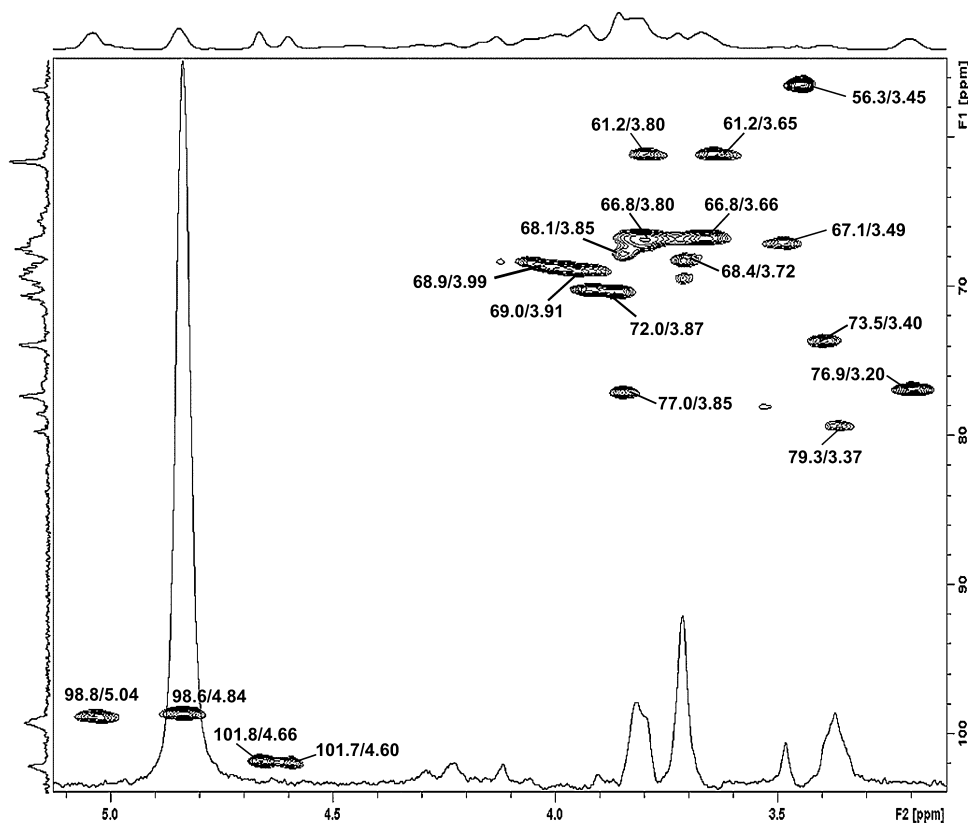


Fig. 2. Elution profiles of PEIs and PEIsR fractions by HPSEC.



**Table 1**<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR assignments [ $\delta$  (ppm)]<sup>a</sup> for the mannogalactan from *P. sajor-caju*.

Residue	Chemical assignments <sup>a</sup>						CH <sub>3</sub> O
	C-1 H-1	C-2 H-2	C-3 H-3	C-4 H-4	C-5 H-5	C-6 H-6	
→2,6)- $\alpha$ -D-Galp-(1→	98.8 5.04	77.0 3.85	69.0 3.91	68.1 3.85	68.9 3.99	66.8 3.80; 3.66	
→6)-3-O-Me- $\alpha$ -D-Galp-(1→	98.6 4.84	68.4 3.72	79.3 3.37	67.3 3.81	68.9 3.99	66.8 3.80; 3.66	56.3 3.45
$\beta$ -D-Manp-(1→	101.8; 101.7 4.60; 4.66	70.2 3.87	73.5 3.40	67.1 3.49	76.9 3.20	61.2 3.80; 3.65	

<sup>a</sup> Assignments were based on NMR experiments (<sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C HSQC and 1D selective TOCSY).**Fig. 3.** HSQC spectrum, which was overlapped by the 1D selective TOCSY using a mixing time of 90 ms, of the mannogalactan (PEIsR) obtained from *P. sajor-caju* in Me<sub>2</sub>SO-*d*<sub>6</sub> at 70 °C. The chemical shifts are expressed in ppm.

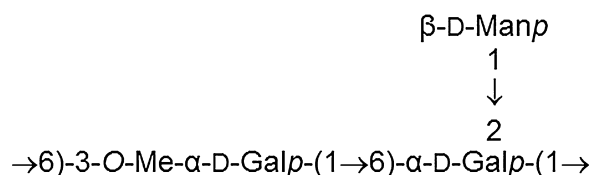
profile through HPSEC (Fig. 2), and its  $M_w$  was  $6.4 \times 10^4$  g/mol ( $dn/dc = 0.141$ ).

The purified fraction (PEIsR) presented mannose (37.0%), galactose (39.7%), and 3-O-methyl-galactose (23.3%). The methylation analysis showed that this fraction contains a highly branched polysaccharide composed of 35.2% of 2,6-di-O-substituted-Galp units, as determined by the presence of the 3,4-Me<sub>2</sub>-Galp derivative. The other galactose units (31.1%) were 6-O-substituted, according to the presence of the 2,3,4-Me<sub>3</sub>-Galp derivative. The branches were constituted by non-reducing end units of mannose, according to the presence of the 2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Manp (33.7%) derivative. These data suggest the presence of a partially methylated mannogalactan in the purified fraction (PEIsR). Based on the methylation data, the possible main fragment of the polysaccharide structure is suggested in Fig. 4.

NMR analysis of the mannogalactan was performed using 1D and 2D NMR experiments. HSQC and 1D selective TOCSY experiments, at different mixing time (20–100 ms), were performed to determine all hydrogen and carbon signatures (Table 1).

The  $\alpha$ - and  $\beta$ -configurations of the monosaccharides were confirmed by the determination of their coupling constants ( $J_{C-1,H-1}$ ). The Galp units showed an  $\alpha$ -configuration ( $J_{C-1,H-1} = 170$  Hz), while Manp units showed a  $\beta$ -configuration ( $J_{C-1,H-1} = 162$  Hz) [24].

The <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C HSQC spectrum of mannogalactan (PEIsR) overlapped in the 1D selective TOCSY (Fig. 3) contains signals at  $\delta$  98.8/5.04, 77.0/3.85, and 66.8/3.80 and 66.8/3.66 ppm, which correspond to the C1/H1, C2/H2, and C6/H6 of 2,6-di-O-substituted  $\alpha$ -D-Galp units, respectively, and signals at  $\delta$  98.6/4.84, 79.3/3.37, and 66.8/3.80 and 66.8/3.66 ppm, which correspond to the C1/H1,

**Fig. 4.** The possible fragment of the chemical structure of the mannogalactan.

C3/H3, and C6/H6 of 6-O-substituted O-Methyl- $\alpha$ -D-Galp units, respectively. The signal of the methyl group of these units was observed at  $\delta$  56.3/3.45 ppm.

Signals corresponding to C1/H1 of the non-reducing end units of  $\beta$ -D-Manp were observed at 101.8/4.60 and 101.7/4.66 ppm. The presence of two C1/H1 signals relative to the Manp units suggested that the non-reducing end units of Manp were present in two different chemical environments of the polysaccharide structure.

According to the NMR analyses, the 3-O-Me- $\alpha$ -D-Galp units were not substituted at O-2 by Manp units because their C2 resonances appeared at  $\delta$  68.4. In addition, the 2,6-O-substituted  $\alpha$ -D-Galp units were not substituted by a methyl group at O-3 because their C3 resonances appeared at  $\delta$  69.0. Therefore, the non-reducing end units of Manp were present as substituents of Galp units at the O-2 position, and 3-O-methyl-Galp units were not substituted by Manp.

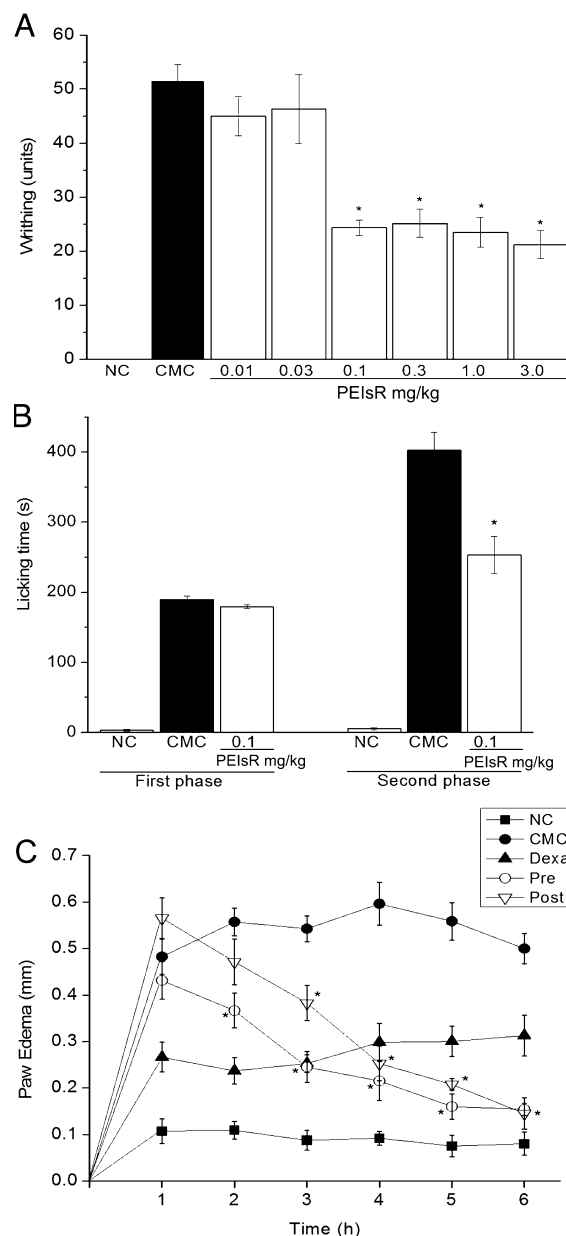
Similar polysaccharides were isolated from the fruiting bodies of *P. geesteranus* [8] and *P. pulmonarius* [6]. The mannogalactan reported by Zhang et al. [8] had the same main chain of (1 $\rightarrow$ 6)-linked  $\alpha$ -D-Galp and 3-O-methyl- $\alpha$ -D-Galp units, and non-reducing end units of Manp as substituent of Galp units at the O-2 position. However, it showed a smaller  $M_w$  ( $1.3 \times 10^4$  g/mol). Smiderle et al. [6] characterized a similar heteropolysaccharide with a  $M_w$  of  $2.39 \times 10^4$  g/mol. In this case, both  $\alpha$ -D-Galp and 3-O-methyl- $\alpha$ -D-Galp units were partially substituted at O-2 by  $\beta$ -D-mannopyranosyl units [6]. Differences on  $M_w$  can reflect differences on isolation procedures or in the procedure adopted for  $M_w$  determination. Zhang et al. [8] calculated the  $M_w$  using dextran standards [8], whereas Smiderle et al. [6] used  $dn/dc$ , as adopted for PEIsR. Therefore, the smaller  $M_w$  of the mannogalactan reported by Zhang et al. [8] may be due to the different procedure adopted for  $M_w$  determination. However, the mannogalactan reported by Smiderle et al. [6] has a real smaller  $M_w$  when compared with PEIsR.

Smiderle et al. [2] have mentioned the presence of mannogalactans as exopolysaccharides of *P. pulmonarius*. They isolated an EPS fraction (FSEPS) constituted by mannose, 3-O-methyl-galactose, and galactose, which suggests the presence of mannogalactans, although no further purification and chemical characterization was performed to confirm this data. The submerged culture of a different strain of the same species (*P. pulmonarius*), using xylose as carbon source, showed galactose and glucose as the main components of the EPS produced [13]. No further information was given about the structure of this polymer. Therefore, this is the first time that a mannogalactan produced by submerged culture fermentation was chemically characterized. Based on this study and previous reports, it seems that similar partially methylated mannogalactans are common to the genera *Pleurotus*, even when they are grown in submerged cultures.

### 3.2. Antinociceptive and anti-inflammatory activities

Initially, the antinociceptive activity of the isolated mannogalactan (PEIsR) was evaluated using the writhing test (Fig. 5A). This model evaluates the manifestations of nociception and reflex responses to peritonitis and peritoneal irritation induced by acetic acid injection [21]. The acetic acid causes a local inflammatory response through the release of prostaglandins, which sensitize the local nociceptors and lead to pain sensation that is observed on the animals through their behavioral responses [22].

The mice treated with doses of 0.1, 0.3, 1.0, and 3.0 mg/kg of mannogalactan presented a statistically significant decrease in the number of contractions induced by acetic acid (Fig. 5A). However, no significant difference was observed among these doses, which, in the mean, reduced at 54.2% the number of contractions. Although the effect was not dose dependent, the mannogalactan presented a marked antinociceptive activity.



**Fig. 5.** Effect of mannogalactan (PEIsR) administration on the number of abdominal writhings induced by acetic acid (A), on the nociception time of the first and second phases of the formalin test (B), and on the paw edema induced by carrageenan (C). The data represent the mean  $\pm$  SEM ( $n=8$ ).

Footnote: Negative control (NC), non-treated group (CMC), dexamethasone (Dexa), group pre-treated with mannogalactan (Pre), and group post-treated with mannogalactan (Post). \*Significant differences compared with the non-treated group (CMC;  $p < 0.01$ ).

To verify whether the mannogalactan (PEIsR) treatment could cause nociception by itself, a dose of 3 mg/kg was administered to an additional control group 30 min prior to an injection of saline (10 mL/kg, i.p.) instead of acetic acid. No contractions were observed, which demonstrates the absence of interference in the test.

The mannogalactan isolated from the fruit bodies of *P. pulmonarius* by Smiderle et al. [6] also demonstrated antinociceptive activity, reducing at 93% the number of contractions induced by acetic acid in mice, at a dose of 30 mg/kg. Therefore, mannogalactans from *Pleurotus* sp. seem to reduce the nociception caused by the acetic acid.

Although the writhing test shows low specificity in the detection of the analgesic effect of a tested drug, it is highly effective for the initial screening of the antinociceptive activity of different compounds [25].

To further characterize the antinociceptive activity of the mannogalactan isolated in this study, we performed the formalin test (Fig. 5B), which provides more specific responses compared to the writhing model. Moreover, the formalin test is considered an experimental model that closely approximates to clinical pain [26]. The main characteristic of the test is the presence of two distinct phases of nociception: neurogenic and inflammatory pain. The 1st phase (neurogenic pain) begins immediately after the formalin injection, it lasts 5 min, and is associated with the direct chemical stimulation of afferent fibers and the release of excitatory molecules. The 2nd phase (inflammatory pain) occurs 15–30 min after the formalin injection and is related to the release of pro-inflammatory mediators, such as bradykinin, prostaglandins, and serotonin [22].

At the formalin test (Fig. 5B), the animals who received the polysaccharide or the vehicle prior to the formalin injection did not show a significant difference in the licking time during the 1st phase ( $179.2 \pm 2.8$  s and  $189.7 \pm 4.4$  s, respectively). This result suggests that the mannogalactan has no effect in the 1st phase of nociception caused by formalin. In contrast, during the 2nd phase, the group treated with the polysaccharide exhibited a licking time of  $253.0 \pm 26.2$  s, whereas the non-treated group showed a licking time of  $402.4 \pm 25.7$  s. These data allowed us to infer that the mannogalactan is efficient for the reduction of nociception during the inflammatory phase of the formalin test.

To confirm that the mannogalactan treatment does not cause nociception by itself, two groups received the vehicle or the PEIsR (0.1 mg/kg, i.p.) 30 min prior to the intraplantar injection of saline instead of formalin. The licking times during the first ( $3.0 \pm 1.2$  s and  $6.3 \pm 1.9$  s, respectively) and second ( $5.3 \pm 1.6$  s and  $11.7 \pm 3.2$  s, respectively) phases for both groups were insignificant, which demonstrates that the mannogalactan cause no interference in the test.

Because a significant inhibition of the second phase of the formalin test was observed, it is possible that the mannogalactan acts by modulating the synthesis of pro-inflammatory mediators, such as histamine, serotonin, bradykinin, and prostaglandins, that are recruited after tissue injury caused by formalin [27]. It is known that anti-inflammatory drugs (steroidal and non-steroidal) reduce the effects on the 2nd phase of the formalin test because these drugs act by blocking the synthesis of inflammatory mediators [28].

The anti-inflammatory action of the mannogalactan was evaluated using the carrageenan test (Fig. 5C), which promotes paw edema by the administration of 1% carrageenan (30  $\mu$ L) into the subplantar region. This model of acute inflammation is divided into three phases. The first stage (fast phase) is detected approximately one hour after the carrageenan injection and causes an increase in the vascular permeability mediated by histamine and serotonin release. The second stage (vascular permeability) occurs due to the release of kinins after approximately two hours. The third phase (tonic phase) occurs three hours after the carrageenan injection and is considered the highest intensity stage. During this stage, the vascular permeability increase is promoted by the release of prostaglandins [29]. The results of the carrageenan test are shown in Fig. 5C.

The group pretreated with the mannogalactan (PEIsR) promoted a marked reduction of the edema 5 h after the administration of carrageenan, this effect was maintained during the sixth hour. The reduction observed at both time-points (5 h and 6 h) reached 71% and 69%, respectively, compared with the non-treated group, which received only the vehicle (CMC) prior to the carrageenan injection. When the treatment was administered after the carrageenan

injection (post-treatment), we observed an edema reduction of 58%, 63%, and 51%, at 4, 5, and 6 h, after carrageenan injection, respectively. The data demonstrated that the mannogalactan is an anti-inflammatory agent as effective as dexamethasone (Fig. 5C).

The mice treated with the vehicle or mannogalactan (PEIsR) followed by a subplantar injection of 0.9% saline instead of carrageenan exhibited no significant edema, which confirms that the inflammatory response was caused by the carrageenan solution and not by the simple administration of a saline solution. These data also show that the mannogalactan does not induce an inflammatory response by itself.

In summary, the biological results showed that the mannogalactan exhibited antinociceptive activity when tested by the acetic acid and formalin tests. In the latter test, the antinociceptive effect occurred during the inflammatory phase. Moreover, the carrageenan test demonstrated that the tested polysaccharide is able to reduce paw edema. The results strongly suggest that the exopolysaccharide of *P. sajor-caju* acts as an anti-inflammatory agent, since it reduces nociception and edema, which are two features of the inflammatory process.

#### 4. Conclusions

Although some studies reported the isolation and chemical characterization of similar mannogalactans from the fruiting bodies of *Pleurotus* spp., this was the first study that used the liquid fermentation to produce a biologically active polysaccharide by *Pleurotus sajor-caju*, and that isolated and characterized it. The treatment of mice with the purified mannogalactan was efficient in the reduction of nociception caused by acetic acid and formalin. Moreover, treatment with the mannogalactan reduced paw edema induced by carrageenan in mice. The antinociceptive and anti-edematogenic effects observed suggest that the *P. sajor-caju* mannogalactan exhibits anti-inflammatory activity.

#### Acknowledgments

The authors would like to thank the Basidiomycetes Cultivation Center of the Botanic Institute of São Paulo for the donation of the *Pleurotus sajor-caju* strain, and the Brazilian funding agencies CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos), FAP (Fundo de Apoio à Pesquisa)/UNIVILLE, and Fundação Araucária.

#### References

- [1] M. Bonatti, P. Karnopp, H.M. Soares, S.A. Furlan, *Food Chem.* 88 (2004) 425–428.
- [2] F.R. Smiderle, L.M. Olsen, A.C. Ruthers, P.A. Czelusniak, A.P. Santana-Filho, G.L. Sassaki, P.A.J. Gorin, M. Iacomini, *Carbohydr. Polym.* 87 (2012) 368–376.
- [3] J. Chen, R. Servioir, *Mycol. Res.* 111 (6) (2007) 635–652.
- [4] N. Dalonso, R. Souza, M.L.L. Silveira, A.A. Ruzza, T.M. Wagner, E. Wisbeck, S.A. Furlan, *Appl. Biochem. Biotech.* 160 (8) (2010) 2265–2274.
- [5] F.R. Smiderle, L.M. Olsen, E.R. Carbonero, C.H. Baggio, C.S. Freitas, R. Marcon, A.R.S. Santos, P.A.J. Gorin, M. Iacomini, *Eur. J. Pharmacol.* 597 (2008) 86–91.
- [6] F.R. Smiderle, L.M. Olsen, E.R. Carbonero, R. Marcon, C.H. Baggio, C.S. Freitas, A.R.S. Santos, G. Torri, P.A.J. Gorin, M. Iacomini, *Phytochemistry* 69 (2008) 2731–2736.
- [7] A. Zhang, Y. Zhang, J. Yang, P. Sun, *Carbohydr. Polym.* 92 (2013) 2239–2244.
- [8] A. Zhang, M. Xu, L. Fu, P. Sun, *Carbohydr. Polym.* 92 (2013) 236–240.
- [9] H.A. El Enshasy, R. Hatti-Kaul, *Trends Biotechnol.* 31 (12) (2013) 668–677.
- [10] F.R. Rosado, E.R. Carbonero, R.F. Claudino, C.A. Tischer, C. Kemmelmeier, M. Iacomini, *FEMS Microbiol. Lett.* 221 (2003) 119–124.
- [11] R.M.M. Gern, E. Wisbeck, J.R. Rampinelli, J.L. Ninow, S.A. Furlan, *Bioresour. Technol.* 99 (1) (2008) 76–82.
- [12] W. Crueger, *Biotechnologia: manual de microbiologia industrial*, Acirbia, Zaragoza, 1993.
- [13] J.W. Shen, C.W. Shi, C.P. Xu, *Food Technol. Biotechnol.* 51 (4) (2013) 520–527.
- [14] S.A. Furlan, L.J. Virmond, D.A. Miers, M. Bonatti, R.M.M. Gern, R. Jonas, *World J. Microb. Biot.* 13 (6) (1997) 689–692.

- [15] I.S. Assis, M.B. Chaves, M.L.L. Silveira, R.M.M. Gern, E. Wisbeck, A. Furigo Júnior, S.A. Furlan, J. Med. Food 16 (11) (2013) 1004–1012.
- [16] P.A.J. Gorin, M. Iacomini, Carbohydr. Res. 128 (1984) 119–132.
- [17] I. Ciucanu, F. Kerek, Carbohydr. Res. 131 (1984) 209–217.
- [18] G.L. Sassaki, P.A.J. Gorin, L.M. Souza, P.A. Czelusniak, M. Iacomini, Carbohydr. Res. 340 (2005) 731–739.
- [19] W.F. Reed, Macromol. Chem. Phys. 196 (1995) 1539–1575.
- [20] Manual, DAWN-DSP, Wyatt Technology, Santa Barbara, 1998.
- [21] R. Koster, M. Anderson, E.J. De Beer, Fed. Proc. 18 (1959), 412–412.
- [22] S. Hunskaar, K. Hole, Pain 30 (1987) 103–114.
- [23] D.L. Komura, A.C. Ruthes, E.R. Carbonero, G. Alquini, M.C.C. Rosa, G.L. Sassaki, M. Iacomini, Carbohydr. Pol. 79 (2010) 1052–1056.
- [24] G.L. Sassaki, M. Iacomini, P.A.J. Gorin, Ann. Brazilian Acad. Sci. 77 (2) (2005) 223–234.
- [25] D. Le Bars, M. Gozariu, S. Cadden, Pharmacol. Rev. 53 (4) (2001) 597–652.
- [26] A. Tjølsen, K. Hole, in: A. Dickenson, J.M. Besson (Eds.), The Pharmacology of Pain, Springer Verlag, Berlin, 1997, pp. 1–20.
- [27] A. Tjølsen, O. Berge, S. Hunskaar, J.H. Rosland, K. Hole, Pain 51 (1) (1992) 5–17.
- [28] K.Y. Fu, A.R. Light, W. Maixner, Neuroscience 101 (4) (2000) 1127–1135.
- [29] M. Di Rosa, J. Pharm. Pharmacol. 24 (2) (1972) 89–102.